

VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Fisiología
Programa de Doctorado en Fisiología (3127)



ESTUDIO DEL PERFIL DE MICRORNAS
CIRCULANTES EN PACIENTES CON DÉFICIT
DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.
IMPLICACIONES DIAGNÓSTICAS, PRONÓSTICAS
Y TÉRAPEUTICAS.



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

SARA PASTOR PUENTE

2017

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Sara Pastor Puente

Dirigida por:
Prof. Dr. Francisco Dasí Fernández
Prof. Dra. Amparo Escribano Montaner

Valencia, Octubre 2017



UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
PROGRAMA DE DOCTORADO:
FISIOLÓGIA (3127)

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL PERFIL DE MICRORNAS CIRCULANTES EN PACIENTES CON
DÉFICIT DE ALFA-1 ANTITRIPSINA.
IMPLICACIONES DIAGNÓSTICAS, PRONÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS.**

SARA PASTOR PUENTE

Directores:

DR. FRANCISCO DASÍ FERNÁNDEZ

DRA. AMPARO ESCRIBANO MONTANER

Valencia, octubre 2017

Francisco Dasí Fernández, doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Asociado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València. Investigador “Miguel Servet”. Fundación Investigación Hospital Clínico de Valencia/Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA y *Amparo Escribano Montaner*, doctora en Medicina y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada: ***“Estudio del perfil de microRNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT). Implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas”***, presentado por Sara Pastor Puente, para optar al Grado de Doctor de la Universitat de València, ha sido realizado bajo su dirección y reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, octubre 2017

FIRMADO:

Prof. Dr. Francisco Dasí Fernández

Prfª Dra. Amparo Escribano Montaner

*“Todas las verdades son fáciles de entender
una vez han sido descubiertas,
la clave es descubrirlas”*

Galileo Galei

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no habría sido posible sin la participación grupo de personas a las cuales quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Francisco Dasí y a la Dra. Amparo Escribano, por guiarme durante el proceso de la tesis, por mostrarme la importancia de un equipo multidisciplinar y enseñarme a integrar en la investigación la parte clínica y del laboratorio. También les quiero agradecer su apoyo y sabios consejos.

A la Dra. Sabina Janciauskiene por acogerme en su laboratorio durante mi estancia internacional en Medizinische Hochschule Hannover en Alemania y a Nupur por hacerme esta estancia más agradable.

Al grupo de bioinformática del Centro de Investigación del Príncipe Felipe, en especial a Paco García, por guiarme en los análisis bioinformáticos con los que tanto he luchado.

A todas las personas que forman o han formado parte del grupo de investigación en enfermedades raras respiratorias, en especial a Shirley, Ana, Silvia y Mer, por todos los buenos momentos vividos ya que, además de trabajar, también nos hemos divertido.

A Guadalupe y Ana Cris, por su gran apoyo e impulso durante los peores momentos de este proyecto.

A los pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina, por colaborar con nosotros en este estudio y a Silvia y Amparo por incentivarlos a participar en él y coordinar todos los pasos hasta que las muestras llegan a mis manos.

Y por supuesto, a mis padres y hermana que, a pesar de la distancia, siempre me han apoyado e impulsado a conseguir mis sueños, ya que sin ellos no sería la persona que soy.

RESUMEN

Antecedentes: El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una condición hereditaria que conduce a la disminución de los niveles circulantes de alfa-1 antitripsina, aumentando significativamente el riesgo de padecer enfermedad pulmonar y hepática grave, en niños y adultos. El DAAT tiene un gran problema de infradiagnóstico y/o retraso diagnóstico. Los microRNAs son pequeños nucleótidos que regulan la expresión génica y están asociados con la patogénesis de numerosas enfermedades pulmonares y hepáticas y podían ser de gran utilidad clínica en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

Objetivos: Identificar los miRNA circulantes que puedan actuar como biomarcadores diagnósticos y pronósticos en el DAAT.

Métodos: El perfil de expresión de los miRNAs plasmáticos se realizó en 56 sujetos donde se incluyen personas sanas y con DAAT, utilizando *microarrays*. Los miRNAs con diferencias estadísticamente significativas se validaron mediante RT-qPCR.

Resultados: El miR-122 disminuye en el DAAT y con la edad; los miR-425 y 151a aumentan su expresión con la presencia del alelo Z; el miR-93 está incrementado en los pacientes deficitarios y es más alto en los que desarrollan enfisema, donde además están aumentados los miR-106a y 17. Los pacientes con hepatopatía tienen una mayor expresión de los miR 107 y 23b.

Conclusiones: El análisis del perfil de miRNAs plasmáticos ha establecido una firma genética que puede ser de utilidad clínica en el diagnóstico y pronóstico del DAAT.

ABSTRACT

Background: Alpha-1 antitrypsin deficiency (AATD) is an inherited condition leading to decreased circulating levels of alpha-1 antitrypsin, which increases significantly the risk of severe lung and liver disease in children and adults. This is a highly under-diagnosed condition and it suffers of diagnostic delay. MicroRNAs are small nucleotides that regulate gene expression and are associated with the pathogenesis of several pulmonary and liver diseases.

Aims: Cell-free circulating miRNAs may serve as diagnostic and prognostic biomarkers in AATD.

Methods: The expression profile of plasma miRNAs was performed in 56 subjects with healthy individuals and with AATD using microarrays. The miRNAs with statistically significant differences were validated by RT-qPCR.

Results: miR-122 decreases with age and AATD, miR-425 and 151a increase their expression with the presence of the Z allele, miR-93 is augmented in deficiency patients and higher when emphysema is developed, in this condition miR-106a and 17 are also raised. Patients with liver disease have a greater expression of miR 107 and 23b.

CONCLUSIONS: MIRNA PLASMA PROFILE HAS ESTABLISHED A GENETIC SIGNATURE THAT MAY BE OF CLINICAL USE IN THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF AATD.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| 8OHdG | 8-hidroxideoxiguanosina |
| aa. | Aminoácido |
| AAT | Alfa-1 Antitripsina |
| AINES | AntiInflamatorios No Esteroideos |
| AMPK | Proteína quinasa activada por AMP, <i>AMP-activated protein kinase</i> en inglés |
| ANCA | Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos |
| ATS | Sociedad americana torácica, <i>American Thoracic Society</i> en inglés |
| AUC | Área bajo la curva, <i>Area Under the Curve</i> en inglés |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| DAAT | Déficit de Alfa-1 Antitripsina |
| DNA | Ácido desoxrribonucleico |
| EN | Elastasa del Neutrófilo |
| EOR | Respuesta a la sobrecarga del RE, <i>ER Overload Response</i> en inglés |
| EPOC | Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica |
| ERS | Sociedad europea del aparato respiratorio, <i>European Respiratory Society</i> en inglés |
| FASN | Sintasa de ácidos grasos, <i>Fatty Acid Synthase</i> en inglés |
| FEV ₁ | Volumen Espiratorio Forzado en 1 segundo |
| FEV ₁ /FVC | Tiffeneau-Pinelli |
| FVC | Capacidad vital forzada |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| IL | Interleuquina |
| LPS | Lipopolisacárido |
| miR | microRNA |
| miRNA | microRNA |
| NRF2 | <i>Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2</i> |
| PCA | <i>Principal Component Analysis</i> |
| PDI | Proteína Disulfuro Isomerasa |

| | |
|------------------|--|
| PDR | Proteína Disulfido Reductasa |
| qPCR | <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| RE | Retículo Endoplasmático |
| REDAAT | Registro Español del Déficit de alfa-1 antitripsina |
| RISC | Complejo silenciador inducido por RNA o <i>RNA-Induced Silencing Complex</i> |
| RMA | <i>Robust Multiarray Average</i> |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RNAsa II | Ribonucleasa II |
| RNA _m | RNA mensajero |
| ROC | Característica Operativa del Receptor, <i>Receiver Operating Characteristic</i> en inglés |
| ROS | Especies Reactivas del Oxígeno, <i>Reactive Oxygen Species</i> en inglés |
| RT | Transcripción Reversa, <i>Reverse Transcription</i> en inglés |
| RT-qPCR | <i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i> |
| SERPINA1 | <i>Serine Protease Inhibitor</i> , grupo A, miembro 1 |
| siRNA | RNA de silenciamiento o <i>small interfering RNA</i> en inglés |
| Skp1 | Proteína asociada a la quinasa en fase S 1, <i>S-phase Kinase-associated Protein 1</i> en inglés |
| TC | Tomografía Computarizada |
| tRNA | RNA transferente |
| UPR | Respuesta a proteínas desplegadas, <i>Uncoupling Folding Response</i> en inglés |
| UTR | Región no traducida, <i>UnTranslated Region</i> en inglés |

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| 1. Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina | 3 |
| 1.1. Historia del déficit de alfa-1 antitripsina | 5 |
| 1.2. El DAAT y las enfermedades raras..... | 7 |
| 1.3. Alfa-1 antitripsina: gen, estructura y funciones | 8 |
| 1.3.1. Gen | 9 |
| 1.3.2. Estructura | 10 |
| 1.3.3. Síntesis y secreción | 11 |
| 1.3.4. Mecanismo de acción | 12 |
| 1.3.5. Funciones..... | 13 |
| 1.4. Variantes de la alfa-1 antitripsina | 16 |
| 1.5. Fisiopatología del DAAT | 19 |
| 1.5.1. Fisiopatología hepática | 20 |
| 1.5.2. Fisiopatología pulmonar | 25 |
| 1.6. Manifestaciones clínicas..... | 26 |
| 1.6.1. Afectación hepática | 28 |
| 1.6.2. Afectación pulmonar | 30 |
| 1.6.3. Otras manifestaciones clínicas | 32 |
| 1.7. Diagnóstico..... | 33 |
| 1.7.1. ¿Cuándo hay que sospechar un DAAT? | 33 |
| 1.7.2. ¿Cómo se hace el diagnóstico? | 34 |
| 1.8. Tratamiento..... | 38 |
| 1.8.1. Tratamiento respiratorio | 39 |
| 1.8.2. Tratamiento hepático | 41 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2. | Introducción: microRNAs..... | 43 |
| 2.1. | <i>Historia de los microRNAs</i> | 45 |
| 2.2. | <i>Biogénesis de los microRNAs.....</i> | 46 |
| 2.2.1. | La ruta canónica..... | 48 |
| 2.2.2. | miRtrons | 50 |
| 2.2.3. | miR-320 y 484..... | 52 |
| 2.2.4. | snoRNA | 52 |
| 2.2.5. | Endo-siRNA | 52 |
| 2.2.6. | Pre-tRNA | 53 |
| 2.2.7. | miR-451 | 54 |
| 2.3. | <i>Mecanismo de acción de los microRNAs</i> | 54 |
| 2.4. | <i>Nomenclatura de los microRNAs.....</i> | 57 |
| 2.5. | <i>microRNAs circulantes.....</i> | 58 |
| 2.6. | <i>Desequilibrio de los microRNAs en enfermedades pulmonares y hepáticas</i> | 60 |
| 2.6.1. | microRNAs circulantes en hepatopatías..... | 60 |
| 2.6.2. | microRNAs circulantes en patologías respiratorias | 61 |
| 3. | Justificación del estudio, hipótesis y objetivos | 65 |
| 3.1. | <i>Justificación del estudio.....</i> | 67 |
| 3.2. | <i>Hipótesis.....</i> | 67 |
| 3.3. | <i>Objetivos.....</i> | 68 |
| 4. | Material y métodos | 69 |
| 4.1. | <i>Pacientes</i> | 71 |
| 4.1.1. | Demografía de los sujetos de estudio | 71 |
| 4.1.2. | Cálculo del tamaño muestral | 72 |
| 4.1.3. | Anamnesis y evaluación general..... | 72 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.1.4. | Recogida de plasma y aislamiento de los miRNAs plasmáticos..... | 73 |
| 4.2. | <i>Determinación del perfil de expresión de los miRNA plasmáticos.....</i> | <i>75</i> |
| 4.2.1. | Preparación del microarray | 75 |
| 4.2.2. | Análisis bioinformático de los resultados de los microarrays | 76 |
| 4.2.2.1. | Pre-procesado | 76 |
| 4.2.2.2. | Expresión diferencial | 77 |
| 4.2.2.3. | Enriquecimiento funcional | 80 |
| 4.2.3. | Validación mediante qRT-PCR a tiempo real | 84 |
| 4.2.4. | Análisis estadístico..... | 86 |
| 4.2.4.1. | Datos demográficos de los pacientes..... | 86 |
| 4.2.4.2. | microRNA validados mediantr RT-qPCR..... | 87 |
| 5. | Resultados: microarray | 89 |
| 5.1. | <i>Pacientes</i> | <i>91</i> |
| 5.2. | <i>Análisis bioinformático.....</i> | <i>95</i> |
| 5.2.1. | Preprocesamiento de los datos | 96 |
| 5.2.2. | Expresión diferencial | 100 |
| 5.2.2.1. | Elección de los microRNAs para validación mediante RT-qPCR..... | 101 |
| 5.2.3. | Análisis de enriquecimiento funcional: análisis del conjunto de genes | 103 |
| 6. | Resultados: RT-qPCR | 109 |
| 6.1. | <i>Validación de los array mediante RT-qPCR</i> | <i>111</i> |
| 6.1.1. | Fenotipo..... | 112 |
| 6.1.2. | Enfisema | 116 |
| 6.1.3. | Hepatopatía | 117 |
| 6.2. | <i>Análisis de enriquecimiento funcional: análisis de sobrerepresentación</i> | <i>120</i> |
| 7. | Discusión | 137 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 8. | Limitaciones del estudio | 151 |
| 9. | Conclusiones | 155 |
| 10. | Bibliografía..... | 161 |
| 11. | Trabajos derivados..... | 192 |
| 11.1. | <i>Comunicaciones científicas.....</i> | <i>194</i> |
| 11.2. | <i>Proyectos de Investigación financiados.....</i> | <i>194</i> |
| 12. | Anexos | 196 |
| 12.1. | <i>Anexo 1.....</i> | <i>198</i> |
| 12.2. | <i>Anexo 2.....</i> | <i>201</i> |
| 12.3. | <i>Anexo 3.....</i> | <i>206</i> |
| 12.3.1. | <i>Anexo 3b : Pruebas para conocer el estado del paciente.....</i> | <i>208</i> |
| 12.4. | <i>Anexo 4.....</i> | <i>209</i> |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Electroforesis en papel en la que se descubrió el DAAT. | 5 |
| Figura 2. Estructura del gen <i>SERPINA 1</i> que codifica para la proteína AAT | 10 |
| Figura 3. Esquema de la AAT nativa. | 11 |
| Figura 4. Propiedades de la alfa 1 antitripsina. | 15 |
| Figura 5. Imagen explicativa de la fisiopatología del DAAT | 20 |
| Figura 6. Diferencias en la producción de AAT entre hepatocitos MM y ZZ..... | 21 |
| Figura 7. Modelo para el aumento de la sensibilidad al estrés RE..... | 23 |
| Figura 8. Edad de manifestación de patologías relacionadas con DAAT grave..... | 27 |
| Figura 9. Microfotografía de hígado humano en un sujeto PiZZ..... | 28 |
| Figura 10. Concentración plasmática de AAT, en μM , en función del fenotipo.. | 35 |
| Figura 11. Algoritmo diagnóstico del DAAT. | 36 |
| Figura 12. Muestra de diferentes fenotipos mediante IEF | 37 |
| Figura 13. Esquema de los potenciales tratamientos para el DAAT. | 39 |
| Figura 14. Rutas atípicas de biogénesis de los microRNAs. | 47 |
| Figura 15. Esquema del procesamiento de la ruta canónica de los microRNAs. | 49 |
| Figura 16. Ejemplos de microRNAs de <i>Drosophila melanogaster</i> | 51 |
| Figura 17. Representación esquemática que muestra que: (A) un microRNA puede tener varios RNAm diana, y (B) un RNAm puede ser reprimido por múltiples miRNAs. | 55 |
| Figura 18. Formas de reconocimiento de los miRNA-RNAm..... | 56 |
| Figura 19. Mecanismos por los que los microRNAs llegan a la circulación..... | 59 |
| Figura 20. Protocolo de extracción del RNA..... | 74 |
| Figura 21. Flujo de trabajo a seguir para el análisis bioinformático de los <i>arrays</i> | 76 |
| Figura 22. Diferencias de fluorescencia por la normalización del <i>array</i> | 77 |

| | |
|---|-----|
| Figura 23. Esquema de los diferentes análisis de expresión diferencial..... | 79 |
| Figura 24. Esquema de los diferentes análisis de expresión diferencial con los filtrados..... | 80 |
| Figura 25. Esquema de cómo pasar de los miRNA a la funciones que inhiben..... | 81 |
| Figura 26. Esquema de la extrapolación de la expresión de los microRNAs a la representación de las funciones..... | 84 |
| Figura 27. Esquema explicativo de la RT universal..... | 85 |
| Figura 28. <i>Clustering</i> no supervisado coloreado por <i>batch</i> | 97 |
| Figura 29. <i>PCA</i> coloreado por fenotipo. | 98 |
| Figura 30. <i>PCA</i> coloreado por enfisema. | 98 |
| Figura 31. <i>Clustering</i> no supervisado coloreado por enfermedad hepática..... | 99 |
| Figura 32. Gráficos de Venny donde se muestran los microRNAs, con diferencias estadísticamente significativas, de los diferentes análisis realizados..... | 100 |
| Figura 33. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del fenotipo. A) miR-93; B) miR-425; C) miR-151a. | 114 |
| Figura 34. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del fenotipo, con co-variables significativas. A) miR-107; B) miR-122; C) let-7d; D) let-7a..... | 115 |
| Figura 35. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del desarrollo de enfisema. A) miR-17; B) miR-93; C) miR-106a..... | 117 |
| Figura 36. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del desarrollo de hepatopatía. A) miR-107; B) miR-23b..... | 119 |
| Figura 37. Esquema que muestra las funciones inhibidas por el miR-122..... | 121 |
| Figura 38. Expresión de A) miR-425 y B) miR-151a, en función de la presencia del alelo PiZ. | 123 |
| Figura 39. Curva ROC para la presencia del alelo PiZ. A) microRNA 151a, B) microRNA 425..... | 123 |

| | |
|---|-----|
| Figura 40. Red que muestra los componentes celulares inhibidos por los microRNAs miR-151a y miR-425. | 124 |
| Figura 41. Esquema de las funciones inhibidas por los miR-425 y 151a..... | 125 |
| Figura 42. Expresión del miR-93..... | 127 |
| Figura 43. Curva ROC para el microRNA-93 de A) la presencia del déficit.y B) la presencia de enfisema..... | 127 |
| Figura 44. Red que muestra los componentes celulares inhibidos por el miR-93. | 127 |
| Figura 45. Esquema de las funciones inhibidas y del número de genes implicados por el microRNA 93. | 128 |
| Figura 46. Curva ROC para la presencia de enfisema A) con el miR-106a.y B) con el miR-17 | 130 |
| Figura 47. Red que muestra los componentes celulares inhibidos por los microRNA miR-106a y 17..... | 130 |
| Figura 48. Esquema de las funciones inhibidas y del número de genes implicados por el microRNA 106a y 17..... | 131 |
| Figura 49. Gráficas de los efectos de la expresión génica del miR-107, tanto con el género como con la presencia del alelo PiZ y hepatopatía | 132 |
| Figura 50. Curva ROC para el microRNA-107 A) frente a la presencia del alelo PiZ.. B) frente a la presencia de hepatopatía. | 133 |
| Figura 51. Esquema de las funciones inhibidas y del número de genes implicados por el microRNA 107. | 134 |
| Figura 52. Curva ROC para el miR-23b frente la presencia de hepatopatía.. | 135 |
| Figura 53. Esquema de las funciones inhibidas por el microRNA-23b y del número de genes implicados. | 136 |
| Figura 54. Funciones hepáticas reguladas por el miR-122..... | 142 |
| Figura 55. Mecanismo de inflamación pulmonar mediada por ROS. | 145 |

| | |
|--|-----|
| Figura 56. Mecanismo de acción propuesto por Bathia <i>et al.</i> por el cual el miR-107 inhibe a la sintasa de ácidos grasos, provocando estrés del RE y acumulación lipídica en el hígado. | 148 |
|--|-----|

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla I: Estimación de población con déficit de alfa-1 antitripsina. | 8 |
| Tabla II: Fenotipos, concentraciones de AAT y riesgo asociado de enfermedad,.... | 18 |
| Tabla III: Recomendaciones para el diagnóstico del DAAT | 34 |
| Tabla IV: Criterios del REDAAT para tratamiento con AAT intravenosa | 40 |
| Tabla V: Características de las diferentes rutas biosintéticas de microRNAs..... | 46 |
| Tabla VI: Propuesta de los microRNAs circulantes como biomarcadores | 62 |
| Tabla VII: Cobertura de miRNAs utilizada con cada una de las bases de datos..... | 82 |
| Tabla VIII: Características clínicas y demográficas de os sujetos de estudio..... | 91 |
| Tabla IX: Características clínicas y demográficas de los sujetos pediátricos. | 93 |
| Tabla X: Características clínicas y demográficas de los adulto | 94 |
| Tabla XI: Selección de microRNAs para la validación mediante qPCR..... | 101 |
| Tabla XII: Resultados de los análisis funcionales de los procesos biológicos | 104 |
| Tabla XIII: Resultados de los análisis funcionales de los componentes celulares . | 105 |
| Tabla XIV: Resultados de los análisis funcionales de las funciones moleculares... | 106 |
| Tabla XV: Resultados de los análisis funcionales de las rutas de señalización | 107 |
| Tabla XVI: Datos demográficos de los pacientes de lavalidación | 111 |
| Tabla XVII: Expresión de los diferentes miRNAs en función del fenotipo | 113 |
| Tabla XVIII: Expresión de los distintos microRNAs en función del enfisema..... | 116 |
| Tabla XIX: Expresión de los distintos microRNAs en función de hepatopatía | 118 |
| Tabla XX: Estimación del número de pacientes necesario para cada uno de los microRNAs signiticaticos en una nueva cohorte de validación..... | 153 |

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

| | |
|---|-----|
| Tabla S 1. Funciones inhibidas por el miR-122..... | 209 |
| Tabla S 2. . Funciones inhibidas por los miR-425 y 151a..... | 215 |
| Tabla S 3. Funciones inhibidas por el miR-93..... | 225 |
| Tabla S 4. Funciones inhibidas por los miR-106a y 17. | 280 |
| Tabla S 5. Funciones inhibidas por el miR-107..... | 332 |
| Tabla S 6. Funciones inhibidas por el miR-23b..... | 355 |

1. Introducción: Déficit de alfa-1 antitripsina

1.1. Historia del déficit de alfa-1 antitripsina

El déficit de alfa-1 antitripsina (DAAT) es una condición genética rara y hereditaria, que incrementa el riesgo de sufrir enfermedad pulmonar o hepática grave en las personas que lo presentan. Esta patología fue descubierta en 1962 por el Dr. Carl-Bertil Laurell cuando -estando investigando con su discípulo Sten Eriksson en la Universidad de Lund, Suecia, el proteinograma de pacientes con diferentes patologías mediante electroforesis en papel-, se observaron que en 5 de las 1.500 muestras analizadas, estaba ausente la banda de las alfa-globulinas (Fig. 1).

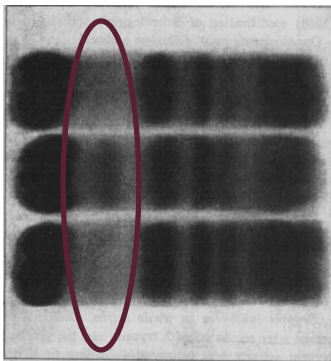


Figura 1. Electroforesis en papel en la que se descubrió el déficit de alfa-1 antitripsina, en 1962. Las tiras superior e inferior corresponden a un pacientes con DAAT y la del medio a una persona sana. Se rodea la banda de las alfa globulinas, modificado de Laurell & Eriksson, 1963 (1).

La curiosidad científica les llevó a revisar la historia clínica de los 5 pacientes a quienes pertenecían estas muestras, descubriendo así que 3 de ellos padecían un enfisema pulmonar diagnosticado a edades tempranas (entre los 35 y 44 años), y que uno de ellos contaba también con antecedentes familiares de problemas

respiratorios. Los resultados se publicaron en la revista *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, y fue la primera vez que se describía el déficit con sugerencias sobre su posible repercusión clínica (1).

En 1965, Eriksson presentó su tesis doctoral “*Estudios de alfa-1 antitripsina*” centrada en el estudio de las familias afectas. En la tesis encontramos una gran familia compuesta por varios hermanos que padecían enfisema, además de 33 pacientes y sus familias, con lo que se confirmó el componente genético y hereditario del déficit que favorecía el desarrollo de enfisema pulmonar a edades tempranas.

Seis años después del descubrimiento, Sharp *et al.* publicaron un estudio en el que examinaban los patrones electroforéticos de niños con cirrosis, encontrando en dos hermanos niveles bajos de alfa-1 antitripsina (AAT), pudiendo correlacionar así el DAAT con la hepatopatía (2). Estos hallazgos les llevaron a ampliar el estudio en otro grupo de niños con cirrosis idiopática encontrando, en 5 de ellos, niveles bajos de AAT (2).

En 1968, Janoff y Scherer demostraron la existencia de la enzima elastasa que era transportada por los gránulos citoplasmáticos primarios de los leucocitos polimorfonucleares, y que poseía una potente actividad elastolítica (3). Al año siguiente se relacionó la actividad de esta enzima con el enfisema pulmonar (4), aunque no fue hasta 1972 cuando se descubrió que la elastasa del neutrófilo (EN) era inhibida eficazmente por la AAT (5).

1.2. El DAAT y las enfermedades raras

Las enfermedades raras son aquellas que afectan a un número pequeño de personas dentro de la población general. En Europa se considera que una enfermedad es rara cuando afecta a 1 persona de cada 2.000 (6). Según la Organización Mundial de la Salud existen alrededor de 7.000 enfermedades raras, y aunque cada una de estas patologías afecta a un número reducido de personas, el total de personas con enfermedades minoritarias es el 7% de la población mundial (más de 400 millones), de los que 3 millones son españoles (7). El DAAT (código de orphanet: ORPHA60), es una entidad con una prevalencia entre 1-5/10.000, con lo que puede considerarse una enfermedad rara (6).

El DAAT se define por niveles séricos disminuidos de la AAT, provocado por los alelos Z, S, raros y nulos. Estudios epidemiológicos realizados en la población española muestran unas frecuencias alélicas PiS y PiZ de 104 y 17 por mil, respectivamente (8). En España existen alrededor de 14.522 personas con genotipo ZZ (9) (con alto riesgo de padecer enfermedad pulmonar o hepática), 174.882 con genotipo SZ (8) y un millón con fenotipo MZ y SS (10). En el Registro Español del Déficit de Alfa-1 Antitripsina (REDAAT), sólo hay registrados 669 pacientes, de los que 75% son Pi ZZ, 20% PiSZ y el 5% restante, portadores de variantes raras (11). Se calcula que existen alrededor de 190.000 personas con déficit grave; esto significa que en España, menos del 0,5% de los pacientes SZ y ZZ están diagnosticados. Esto muestra el gran problema de infradiagnóstico que sufre esta condición genética (10). Las estimaciones de número de pacientes con DAAT en población mundial se muestran en la tabla I (8, 9).

Tabla I: Estimación de población con déficit de alfa-1 antitripsina.

| | Mundial | Europa | America y Caribe | Asia | Australia y Nueva Zelanda |
|-----------------|-----------|---------|------------------|--------|---------------------------|
| PiZZ (9) | 119.594 | 91.940 | 3.824 | 4.126 | 6.342 |
| PiSZ (8) | 1.490.816 | 708.792 | 582.984 | 77.940 | 35.176 |

1.3. Alfa-1 antitripsina: gen, estructura y funciones

La alfa-1 antitripsina es una glucoproteína de la familia de las serpinas, ampliamente distribuida entre los seres vivos, desde los metazoos y plantas hasta ciertos virus (12). Las serpinas cuentan con una estructura muy similar y una gran homología de secuencia; su tamaño se encuentra entre los 300 y 350 aminoácidos (aa) y su principal función es la inhibición de las proteasas, aunque algunos estudios muestran su implicación en la proteólisis de rutas celulares asociadas con la supervivencia, el desarrollo y la defensa celular (13).

La AAT es la principal inhibidora de las serin proteasas en el plasma humano, incluyendo la EN (su principal sustrato), la tripsina, quimiotripsina, catepsina G, pasmina, plaminógeno, trombina, etc. (14). Tiene una vida media en sangre de entre 3 y 5 días (15) y es una de las principales proteínas reactantes de fase aguda, por lo que su concentración sérica se incrementa durante los procesos inflamatorios e infecciosos (16). La AAT se produce en los hepatocitos y, en menor

medida, por los monocitos, macrófagos, células epiteliales alveolares, enterocitos, células alfa y beta del páncreas y por células cancerosas (17-20).

1.3.1. Gen

Esta proteína está codificada por el gen *SERPINA1* (*Serine Protease Inhibitor*, grupo A, miembro 1), localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (posición q31-32,3) (21). Su longitud es de 12,2KB y está constituido por 7 exones, 3 no codificantes (IA, IB, IC) y cuatro codificantes (II, III, IV y V), y por 6 intrones (22, 23) (Fig. 2). La expresión del gen está regulada por una región promotora que se encuentra en el área 5' UTR del gen y por un *splicing* alternativo. Esta región está compuesta por tres promotores diferentes del inicio de la transcripción: el IA, que se expresa principalmente en los leucocitos y en el tejido pulmonar; el IB, que es muy específico de los monocitos y macrófagos, que son los leucocitos que expresan AAT y el único cuyos niveles de expresión se correlacionan con los niveles proteicos circulantes (24); y, por último, la región IC, que da lugar a los transcritos en los hepatocitos, pulmones, riñones y páncreas (24, 25) (Fig. 2). Esto hace que los pre-RNA mensajeros de la AAT producidos en los diferentes tipos celulares, sean de longitudes diferentes, siendo el transcrito de los hepatocitos el más corto. El triplete de inicio de la traducción se encuentra en el I exón y el codón de *stop* en el V y último exón (23), lo que significa que, aunque los diferentes transcritos del gen tengan diferentes tamaños, la proteína traducida de ellos es de la misma longitud.

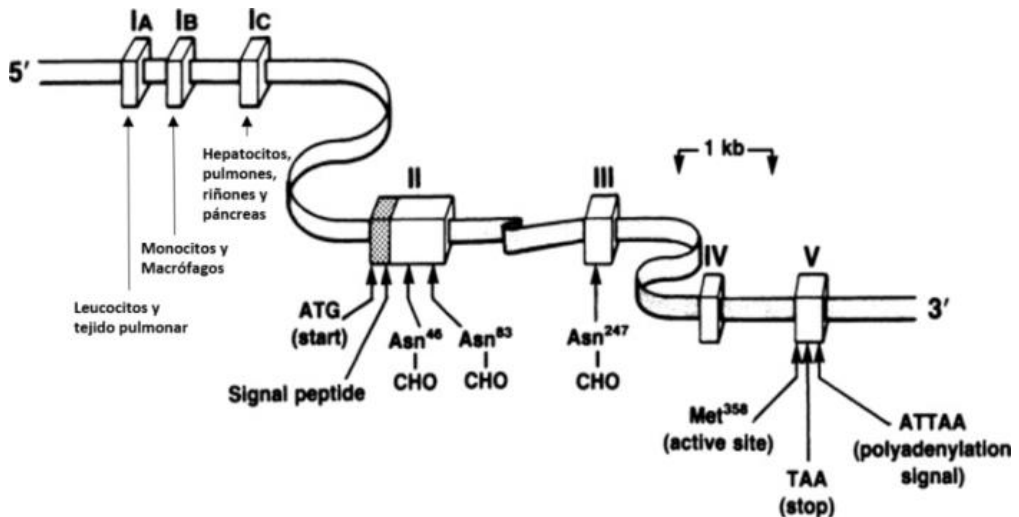


Figura 2. Estructura del gen *SERPINA 1* que codifica para la proteína AAT. Figura modificada de Crystal *et al.*, 1989 (23).

1.3.2. Estructura

La AAT es una glucoproteína circulante, hidrosoluble, difundible en los tejidos, con un peso molecular de 52 kDa (15). Primero se traduce la forma inmadura, compuesta por 418aa, de la que se escinden 24 antes de ser secretada al torrente sanguíneo (25). La forma madura está constituida por la cadena central de 394aa donde se unen tres cadenas de carbohidratos ramificados mediante tres residuos de Asparagina (Asn) en las posiciones 36, 83 y 247. Está constituida por 9 hélices α (nombradas desde A hasta I) y 15 láminas β (A1-5, B1-B6, C1-4) (26). Estas estructuras forman un armazón que da soporte al bucle móvil que sobresale, donde se encuentra el centro activo de la proteína (Met-358 y Ser-359) (27) (Fig. 3).

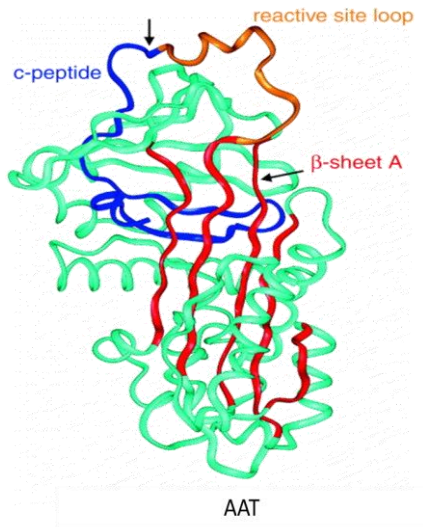


Figura 3. Esquema de la AAT nativa. El centro reactivo (amarillo), hoja- β A (rojo) y el extremo C-terminal (azul oscuro) en relación con el resto de la estructura (verde), modificada de Janciauskiene S, 2001 (26).

1.3.3. Síntesis y secreción

La AAT, al ser un reactante de fase aguda, está activada fundamentalmente por moléculas inflamatorias, como los lipopolisacáridos (LPS), $\text{TNF}\alpha$, interferón, y una diversidad de citoquinas (28). Además, otras serin proteasas, el equilibrio proteasa-antiproteasa y los complejos AAT-elastasa actúan como autorreguladores (15).

Alrededor del 80% de la AAT circulante es sintetizada y secretada por los hepatocitos y, en menor medida, por los monocitos, macrófagos, células epiteliales alveolares, enterocitos, células alfa y beta del páncreas y por células cancerosas (17-20). Los hepatocitos expresan unas 200 veces más transcrito de AAT que el resto de las células que lo producen (29).

En condiciones basales, en individuos sin DAAT ni enfermedad inflamatoria que aumente los niveles de AAT, la concentración sérica es de 150 a 350mg/dL (20 - 48μM) (30), pero además, la AAT también está presente en otros fluidos biológicos como saliva, lágrimas, leche, semen, orina y bilis. Durante los procesos inflamatorios e infecciosos, los niveles plasmáticos se incrementan rápidamente, triplicándose o cuadruplicándose, mientras que en el tejido afecto puede aumentar hasta 11 veces, debido a su producción por las células inflamatorias residentes o las que llegan desde el torrente sanguíneo en respuesta a las citoquinas liberadas durante el proceso inflamatorio (16).

1.3.4. Mecanismo de acción

El principal sustrato de la AAT es la EN e interacciona con ella con una constante de asociación del orden de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (31, 32). La EN es una serin proteasa que tiene una amplia especificidad de sustratos. La EN libre se localiza principalmente en el tejido pulmonar y durante los procesos inflamatorios destruye las bacterias y tejido del huésped (33), por lo que su exceso provoca enfisema, debido a la destrucción del parénquima pulmonar (34, 35).

La AAT se une a la EN a través de un residuo de metionina en la posición 358, localizado en el bucle del centro activo de la proteína, donde inserta su triada catalítica (Hys41-Ser173-Asn88). A raíz de esta unión, se produce un cambio conformacional drástico, por el que el lazo reactivo en hoja-β se transloca, provocando una inmovilización de la proteasa que queda atrapada dentro de la AAT; este mecanismo se ha denominado “trampa para ratones” o “catapulta”. El resultado es un complejo irreversible e inactivo EN-AAT (proteasa-antiproteasa) y,

además del complejo, se desprenden dos residuos, amino-terminal y carboxi-terminal. Estos restos y el complejo son reconocidos por los receptores de los macrófagos y fagocitados para su destrucción (36, 37).

1.3.5. Funciones

En la figura 4 se muestra un esquema de las funciones que desempeña la AAT. Como ya se ha mencionado, la principal función de la AAT es la **inhibición** de las **serin proteasas**, y aporta al suero más del 90% de su capacidad antiproteasa (36) ya que, además de inhibir la EN con una constante de asociación muy alta, inhibe otras serin proteasas y otras proteasas con constantes de asociación más bajas, como la proteinasa-3 (38), catepsina G (38, 39), triptasa y quimasa (40), varias calicreinas tisulares (41), uroquinasa (42), caspasas (43), calpaina I (44), matriptasa (45),....etc.

La inhibición de la matriptasa (45), una serin proteinasa transmembrana ligada a los canales de sodio en las células epiteliales, bloquea el transporte de Na^+ lo que favorece el aclaramiento mucocilar (46).

Además, la AAT está implicada en una gran diversidad de procesos biológicos, entre los que destaca la regulación del sistema inmune, lo que ha abierto la investigación del uso de AAT en patologías inflamatorias, infecciosas y auto-inmunes.

Algunas de las propiedades como proteína **antiinflamatoria** son el bloqueo de la citotoxicidad de las defensinas de los neutrófilos (47) y del efecto inflamatorio (48). Además, modula la proliferación y citotoxicidad linfocitaria (49). La AAT regula la expresión de CD14 y del receptor *toll-like* 4 neutralizando el lipopolisacárido

bacteriano y previniendo la sobreactivación de monocitos *in vivo* (50). También regula la unión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10, a la proteína quimioatrayente monocítica 1 (51-53).

Un estudio realizado por Jedicke *et al.*, muestra que la AAT es efectiva a la hora de prevenir una lesión hepática aguda, por **inhibición** directa de las **caspasas** 3 y 8. También demuestra que los ratones tratados con AAT exógena reducen los niveles séricos de TNF α lo que, a su vez, disminuye la actividad de la ADAM17 (43). La actividad de la caspasa 3 también es inhibida por la AAT en modelos celulares de diabetes tipo 1 (54), y en células endoteliales pulmonares (55). Igualmente, inactiva la caspasa-1 en un modelo de infarto agudo de miocardio en el ratón (56).

En concentraciones fisiológicas normales, la AAT promueve la proliferación de fibroblastos y la producción de procolágeno en dichas células (57), con lo que contribuye a la **reparación del tejido conectivo**.

Asimismo, se han descrito propiedades **antimicrobianas**. La AAT inhibe la entrada del VIH-1 en los linfocitos T *helper* mediante la interacción con gp41 por su extremo C-terminal, inhibiendo así la infección por este virus (58). También posee efectividad contra las bacterias *Moraxella catharralis* (59), *Escherichia coli* (60), *Pseudomonas aeruginosa* (61, 62), *Mycobacterium abscessus* (63), y frente a los protozoos *Entamoeba histolytica* (64) y *Cryptosporidium parvum* (65), probablemente por la inhibición de sus proteasas.

Además, la AAT actúa como **antioxidante** debido a su elevada cantidad de metioninas, exactamente nueve, y estos aminoácidos protegen a las proteínas del daño oxidativo (66). Las metioninas pueden ser oxidadas, sobre todo dos [351 y 358], pero su oxidación conlleva a la pérdida de la actividad anti-elastasa (67),

aunque no de las propiedades inmunomoduladoras (53). Asimismo, la administración exógena de AAT incrementa la defensa enzimática antioxidante (SOD y GPx), previene el desarrollo de preclampsia (68) y, probablemente, de otras enfermedades vinculadas al estrés oxidativo.

Por otra parte, tanto la AAT oxidada como la no oxidada inhiben la producción de citoquinas inducidas por LPS (TNF α e IL-1 β), e incrementan la producción de IL-10, lo que ha sido comprobado *in vitro*, en un modelo de monocitos humanos (53). Del mismo modo, las formas nativa y oxidada de la AAT son igualmente efectivas en la inhibición directa de las caspasas 3 y 8 en homogeneizados hepáticos y sistemas libres de células *in vitro* (43), lo que muestra que la oxidación de la AAT no interfiere con sus propiedades inmunomoduladoras, aunque podría tener otras consecuencias como el incremento de la agregación y proteólisis o la alteración de su internalización a las células (69).

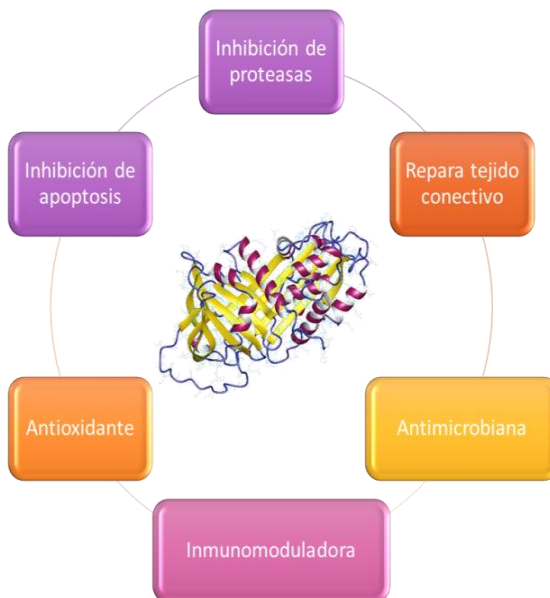


Figura 4. Propiedades de la alfa 1 antitripsina.

1.4. Variantes de la alfa-1 antitripsina

El gen *SERPINA1* es un gen muy polimórfico en el que, hasta la fecha, se han encontrado más de 100 variantes (70) que van aumentando día a día (71). Se transmite a la descendencia por herencia mendeliana simple, autosómica y codominante (72).

Las mutaciones producidas pueden traducirse en: una **proteína normal**, con un cambio a nivel del DNA que no afecta su función; una **proteína deficitaria**, con niveles séricos disminuidos; una **proteína disfuncional**, con niveles séricos normales, pero con una actividad anti-elastasa disminuida o ausente; o ser un **alelo nulo**, caracterizado por la ausencia total de la AAT en el torrente sanguíneo, debido a la ausencia de producción de proteína debido a un codón de STOP prematuro.

Estas variantes se clasificaron inicialmente en función de la velocidad de migración electroforética en un gel de almidón y pH ácido. Las diferentes variantes se denominaron con distintas letras según su velocidad de migración electroforética: a la proteína no mutada la nombraron Pi M – de velocidad media, *médium*-; Pi F a las de migración rápida –*fast*-; Pi S a las de migración lenta –*slow*- y Pi Z –por ser la última letra del abecedario-, a las de migración muy lenta (73).

El **alelo M** produce una AAT normal, y se encuentra en el 95% de la población caucásica (74).

El **alelo Z** es el alelo deficitario más frecuente. Es una mutación puntual en el exón V, con un cambio de adenina por guanina, ubicado a 17 aa del centro activo, produciendo una alteración en la posición 342 de un ácido glutámico por una lisina que da lugar a una proteína metaestable (M*). Esta mutación provoca una

apertura en la lámina- β -A, favoreciendo la unión con otra AAT, induciendo la formación de polímeros. Estos polímeros no pueden salir del retículo endoplasmático (RE) de los hepatocitos, aumentando el riesgo de hepatopatía en los homocigotos para este alelo. La homocigosis de este alelo se asocia con niveles séricos de entre 10-15% (75).

El **alelo S** es el segundo alelo deficitario más frecuente. Al igual que el Z es una mutación puntual, pero en el exón III, con un cambio de una adenina por una timina, produciendo una alteración de la proteína en la posición 264 de un ácido glutámico por una lisina (76). Esto también provoca un cambio estructural que permite su polimerización, pero en menor medida que el alelo Z, lo que facilita su degradación intracelular, por lo que el riesgo de hepatopatía sólo se incrementa si este alelo se combina con el alelo Z (77). La homocigosis de este alelo S se asocia con niveles séricos de entre 50-60% (75).

Los niveles séricos y el riesgo de padecer enfermedad tanto pulmonar como hepática asociados a los diferentes fenotipos del DAAT se muestran en la tabla II.

Tabla II: Fenotipos, concentraciones de AAT y riesgo asociado de enfermedad, modificado de Vidal *et al.* (78).

| Fenotipo | [AAT plasmática] | | Riesgo de enfisema | Riesgo de hepatopatía |
|-------------|------------------|---------|-------------------------|-----------------------|
| | μM* | mg/dL* | | |
| MM | 20-39 | 103-200 | Sin aumento | Sin aumento |
| MS | 19-35 | 100-180 | Sin aumento | Sin aumento |
| SS | 14-20 | 70-105 | Sin aumento | Sin aumento |
| MZ | 13-23 | 66-120 | Posible ligero aumento | Ligero aumento |
| SZ | 9-15 | 45-80 | Ligero aumento (20-50%) | Ligero aumento |
| ZZ | 2-8 | 10-40 | Alto riesgo (80-100%) | Alto riesgo |
| Nulo | 0 | 0 | Alto riesgo | Sin aumento |

*Valores obtenidos por nefelometría

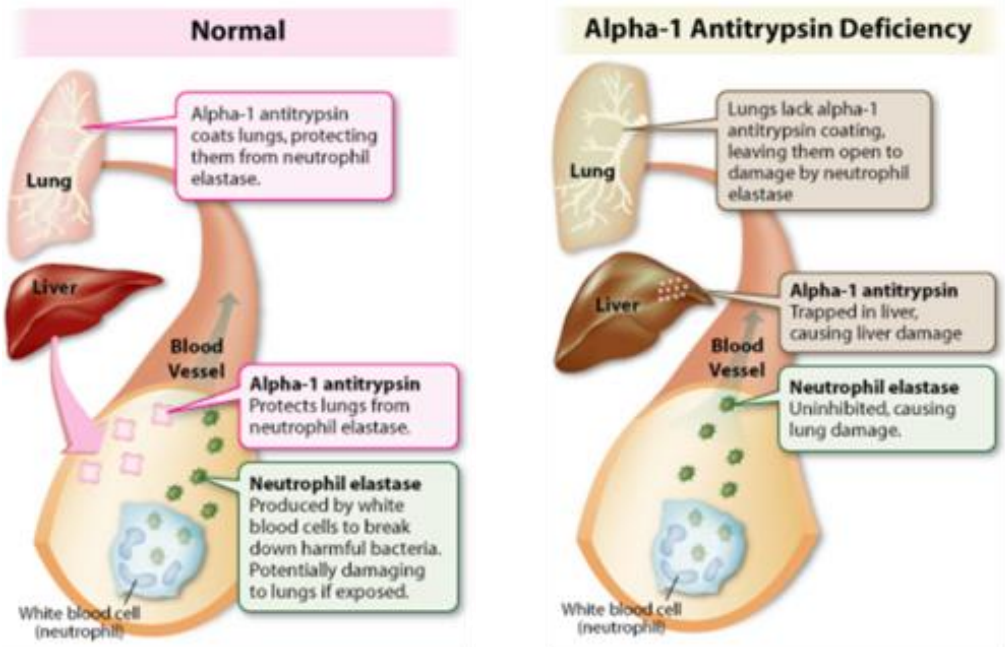
AAT <15μM (80mg/dL) se asocia a un riesgo incrementado para enfisema pulmonar

Aparte de estos alelos frecuentes, existe una gran variedad de los denominados alelos “raros”, aunque las investigaciones realizadas en los últimos años (sobre todo desde la llegada del genotipado) parecen indicar que la frecuencia de estos alelos no es tan baja como se pensaba inicialmente (79). En un estudio realizado en España se observó que 4,5% de los pacientes adultos con concentraciones de AAT menores de 120mg/dL, portaban alguno de estos raros alelo (80). Este dato concuerda con otros estudios como los dos realizados en Italia donde hallaron 1,24% (81) y 4% (82); 2,79%, en Suiza (83); 4,24%, en Túnez (84); o 0,59% (85) y 2,8% (86), en Alemania. Además, en el año 2007, el registro internacional de pacientes con DAAT en el que participaron 21 países, revela que 5,3% de los pacientes con DAAT grave tienen alelos raros (79). La variabilidad en los resultados puede ser debida a la distinta distribución de los diferentes alelos; por ejemplo, en

ciertas regiones de Italia hay una gran prevalencia del alelo Mmalton (81), mientras que en España el alelo I es el más prevalente (87).

1.5. Fisiopatología del DAAT

El DAAT grave se define por niveles séricos de AAT por debajo del 35% de los valores normales, 50mg/dL u 11 μ M (88) y están generalmente relacionados con los fenotipos ZZ o con combinaciones de alelos Z, S, raros y nulos. En condiciones normales, la AAT se produce principalmente en el hígado, de donde es secretada al torrente sanguíneo para ser transportada hasta los pulmones, donde ejerce su principal función, inhibir la elastasa del neutrófilo. La combinación de algunas de estas mutaciones (S, Z y algunas variantes raras) producen una acumulación de polímeros de AAT en el RE de los hepatocitos, lo que puede provocar daño hepático en algunos pacientes. Este acúmulo, o la ausencia de producción de proteína en los pacientes con alelos nulos, impide que la AAT alcance el torrente sanguíneo y, por consiguiente, los pulmones. La disminución de la cantidad de AAT en los pulmones ocasiona un exceso de elastasa no inhibida, que destruye el tejido pulmonar (Fig. 5).



<http://learn.genetics.utah.edu/>

Figura 5. Imagen explicativa de la fisiopatología del DAAT (89).

1.5.1. Fisiopatología hepática

El daño hepático se produce debido a la toxicidad que los polímeros provocan en los hepatocitos (Fig. 6).

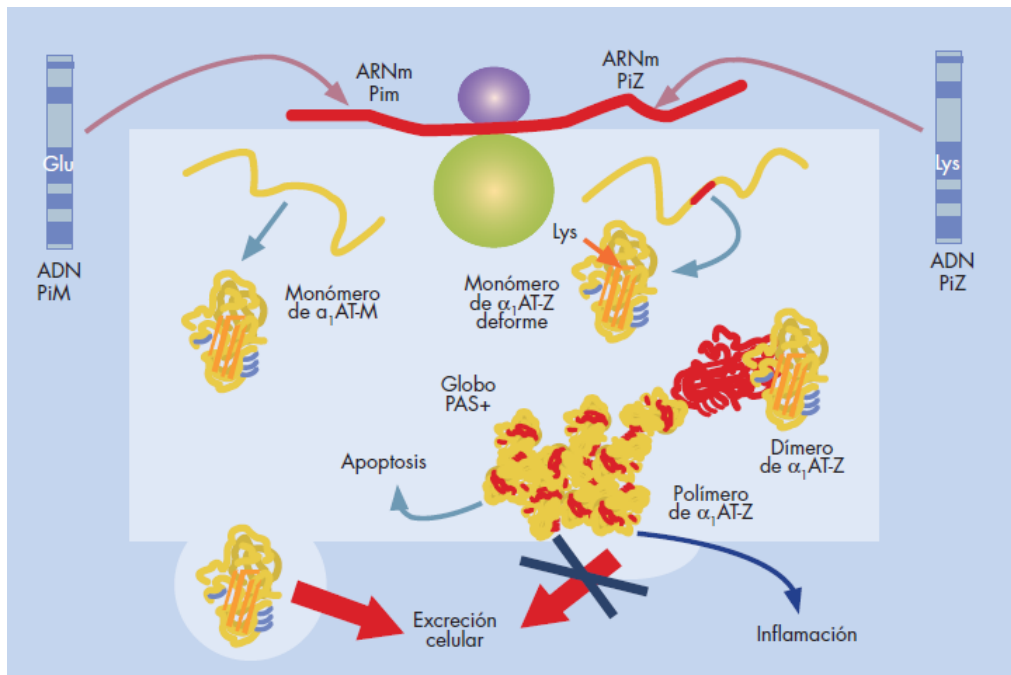


Figura 6. Diferencias en la producción de AAT entre hepatocitos MM y ZZ (90).

Los mecanismos que provocan este daño no están claros. Mientras algunos experimentos apoyan que se produce a través de la vía clásica de estrés en el RE, la UPR (*Uncoupling Folding Response*) (91, 92), otros experimentos la refutan (93-95). Esto podría ser debido a que la vía UPR necesita un segundo estrés para activarse. Lawless *et al.* comprobaron que sólo la expresión del polímero Z-AAT en las células CHO no induce la UPR, pero cuando se añade tapsigargina (un estresante del RE), o calor, ésta se activa (96). Ordóñez *et al.* también avalan esta teoría, al observar que las células formadoras de polímeros (Z-AAT) sólo activan la respuesta a la sobrecarga del RE (EOR, *ER Overload Response*), mientras que en las células que expresan AAT truncadas sólo se activa la UPR, aunque normalmente ambas rutas ocurren de forma paralela. Los datos de este estudio revelan que los polímeros de AAT (Z-AAT) se acumulan de forma esférica y producen una pérdida de la red

tubular en el RE, formando un RE vesiculado y alterando la movilidad de las proteínas lumenares (93, 95). La vesiculación del RE se asocia además con otros estreses celulares, incluyendo la lesión mecánica y el aumento de la concentración de calcio citosólico (97, 98). Mientras que los polímeros truncados activan la UPR, son eficientemente degradados por el proteasoma y modifican la ultraestructura del RE, ensanchando las cisternas; los polímeros Z-AAT no activan esta ruta, aunque sí las chaperonas de la ruta EOR. Por otra parte, en las células que sufren EOR, las proteínas malplegadas no se pueden mover libremente, disminuyendo su accesibilidad al control de calidad requerido para su plegamiento y transporte. Por el contrario, en células con RE reticular y muy interconectado, las chaperonas pueden llegar hasta el lugar donde se encuentran las proteínas malplegadas y resolver el estrés. Con todo esto, proponen un modelo (Fig.7) en el que el descenso de la movilidad o disponibilidad de las chaperonas del RE, debido a cambios en las características de la difusión y/u obstrucción causado por la sobrecarga de proteínas, sensibiliza a la célula para la subsecuente activación de la UPR (93, 95).

Por otra parte, un estudio llevado a cabo en ratones que expresan el alelo Z del gen *SERPINA1*, como modelo de estrés crónico, muestra que la polimerización de la AAT no provoca incremento de las proteínas más importantes de la UPR (calnexina, Gpr78, Gpr94 y PDI). La proteína disulfuro isomerasa (PDI), isomerasa y chaperona más abundante en el RE se halló unida a la proteína Z. La actividad proteína disulfido reductasa (PDR) se lleva a cabo predominantemente en el RE por la PDI, que está disminuida en estos ratones transgénicos, probablemente por el secuestro de la PDI en los agregados Z-AAT.

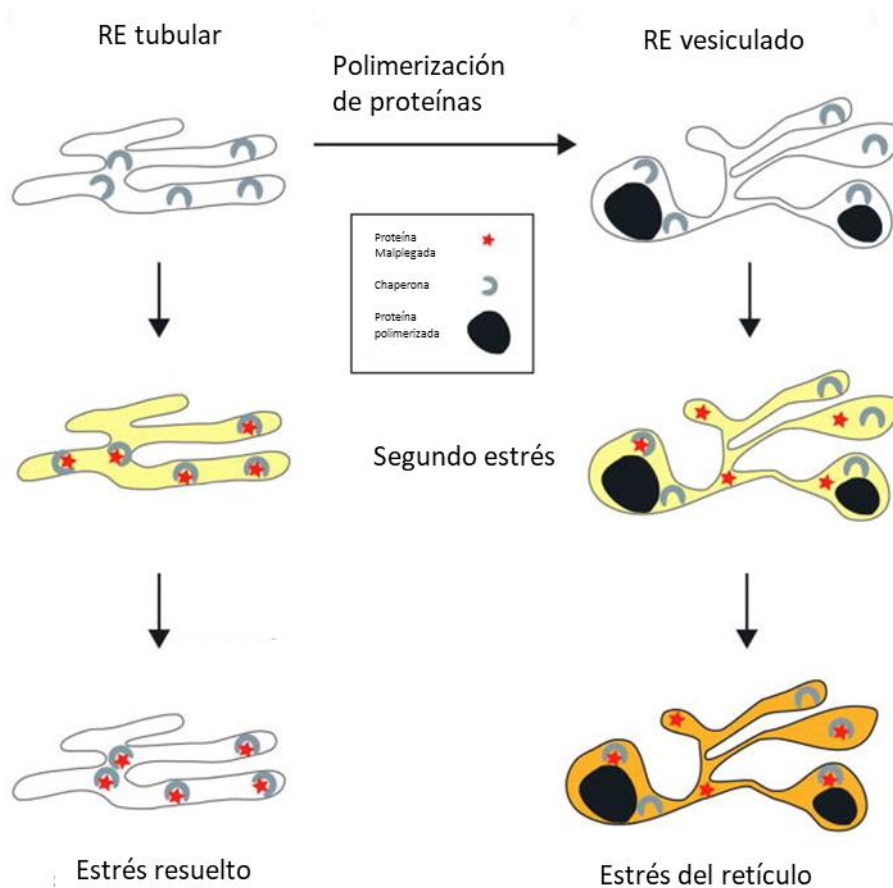


Figura 7. Modelo para el aumento de la sensibilidad al estrés RE observada en las células que experimentan una sobrecarga RE, modificada de Ordóñez *et al.*, 2013 (95).

Además, se observó que los ratones PiZZ tenían el RE más reducido, con una mayor cantidad de grupos tiol en las proteínas, glutatión reducido (GSH) y cociente glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG). Por otro lado, se observó un estado redox más oxidado en el citoplasma, con la misma cantidad de grupos tiol en las proteínas y en el GSH, aunque la relación GSH/GSSG estaba ligeramente disminuida (94). Esto concuerda con los resultados de un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, en el que se encuentra que los niños con DAAT tienen estrés

oxidativo sistémico, en parte, por una disminución de los niveles de GSH (99). Así, el cambio del potencial redox del RE hacia un estado más reducido promueve que la PDI actúe como chaperona en lugar de como una disulfuro isomerasa (100). La reducción de los disulfuros de la PDI, así como la baja disponibilidad de la misma, explicaría la deficiencia de PDR en los ratones transgénicos PiZZ (94). Esto podría deberse a una adaptación del RE, al igual que sucede en otros modelos de estrés a largo plazo, como la diabetes (101). El conjunto de estos datos sugieren un mecanismo de rescate propiciado por un estrés no letal, a largo plazo, durante el cual se mantiene un estado estacionario menos productivo pero más protector, del retículo endoplasmático, en el que un ambiente más reductor protege al RE del estrés oxidativo y la apoptosis, lo que conlleva un cambio de actividad de la PDI, de oxidoreductasa a chaperona (94). En conclusión, este estudio sugiere un modelo de estrés crónico del RE, donde se activan diferentes rutas de protección celular, en la que se sacrifica la eficiencia del plegamiento de las proteínas por la supervivencia a largo plazo (94).

Con todos estos datos se puede entender que la diferencia entre homocigotos ZZ que desarrollan hepatopatía y los que no, podría erradicar en la posibilidad de adaptación al estrés de manera crónica, o no, considerándolo un estrés puntual que conduciría a la activación de otras rutas (EOR o UPR) que llevarían a la activación de la apoptosis.

1.5.2. Fisiopatología pulmonar

Tradicionalmente se ha pensado que el daño pulmonar en pacientes con DAAT está provocado por el desequilibrio proteasa–antiproteasa, aunque otras hipótesis sugieren que podría deberse también a otras causas.

El daño pulmonar en los pacientes con DAAT podría producirse por la combinación de una pérdida (desequilibrio proteasa-antiproteasa) y una ganancia de función (quimiotáctico e inflamatorio) de la AAT, en la que también influyen factores exógenos (como el humo del tabaco) y endógenos (como otras mutaciones, epigenética,...)

Teoría del desequilibrio proteasa-antiproteasa: La falta de AAT en el órgano diana evita la inhibición de la elastasa dejando al tejido expuesto a su efecto proteolítico y conduciendo al desarrollo de enfisema (102). Las toxinas del tabaco y la presencia de microorganismos son desencadenantes de una respuesta inflamatoria neutrofílica, una de las moléculas más importantes de este proceso inflamatorio es la EN, y la ausencia de su principal inhibidor (AAT) prolonga el efecto de la EN.(103).

Teoría de los mediadores quimiotácticos: El LTB4 y los fragmentos degradados de la elastina son potentes quimiotácticos de neutrófilos que generan elastasa que daña el tejido en ausencia del inhibidor (103). Esto ha podido comprbarse mediante el hallazgo de concrementaciones elevadas de LTB4 en esputo de pacientes con DAAT (104) y en un modelo de enfisema murino (105). Todos estos datos hacen pensar que el incremento de mediadores quimiotácticos podría jugar un papel importante en la fisiopatología del DAAT (103).

Polimerización de la AAT en el tejido pulmonar: La producción de AAT anormal en las células pulmonares y su polimerización in situ tiene capacidad quimiotáctica de neutrófilos (106, 107) y activadora de la cascada inflamatoria además de producir estrés del RE (108), lo podría contribuir al desarrollo de enfisema. Esta teoría se sustenta en el hallazgo de polímeros de AAT en el LBA de pacientes con DAAT incluso después de recibir un trasplante hepático, es decir, cuando ya no producen AAT anormal en el hígado (106). Además, otro estudio demuestra que, a mayor cantidad de polímero circulante, es también mayor la posibilidad de desarrollar EPOC (109)

1.6. Manifestaciones clínicas

El DAAT grave se define por niveles séricos de AAT por debajo del 35% de los valores normales, 50mg/dL u 11 μ M (88) y están generalmente relacionados con los fenotipos ZZ o con combinaciones de alelos Z, S, raros y nulos. Un gran porcentaje de estos pacientes desarrolla enfisema pulmonar, otros hepatopatía, y una minoría sufre vasculitis o paniculitis. Sin embargo, un tercio de ellos no presentará ninguna sintomatología clínica a lo largo de su vida (110). En la tabla II, se muestra la relación entre el fenotipo, la concentración de AAT y el riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar o hepática. Los pacientes con alelos nulos no producen proteína, con lo que no aumenta el riesgo de padecer hepatopatía, pero tienen una alta probabilidad de desarrollar enfisema debido a la ausencia de AAT. Los pacientes homocigotos para el alelo Z tienen una gran disminución de AAT circulante, lo que incrementa el riesgo de enfisema; la AAT se queda retenida en el hígado lo que también aumenta el riesgo de hepatopatía. Los sujetos MZ y SZ

tienen un ligero aumento de enfisema y/o hepatopatía, mientras que los individuos MS y SS no tienen riesgo de desarrollar enfermedad debido al déficit.

En la figura 8 se muestra cómo aumenta la posibilidad de desarrollar enfermedad pulmonar o hepática según se eleva la edad de los pacientes con déficit grave de AAT. El riesgo de EPOC comienza alrededor de los 30 años, incrementándose progresivamente con la edad; mientras que el riesgo de hepatopatía se concentra en el primer año de vida y a partir de los 50 años. El 96% de los pacientes que presentan manifestaciones clínicas relacionadas con el DAAT poseen el fenotipo PiZZ y el 4% restante se distribuye entre los SZ y las variantes raras y nulas (111).

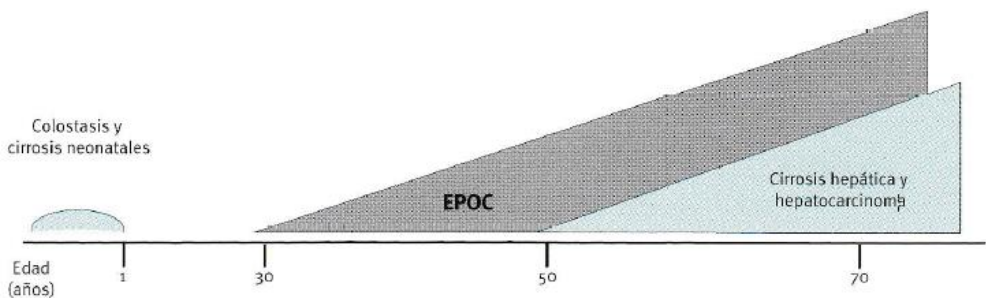


Figura 8. Edad de manifestación de patologías relacionadas con DAAT grave (112).

Toda esta marcada variabilidad clínica demuestra que el DAAT no es una enfermedad en sí misma, sino un desorden monogénico complejo que predispone al desarrollo de diferentes patologías, donde además del DAAT, juegan un importante papel, factores exógenos favorecedores y/u otros genes modificadores, donde cabe destacar el consumo de tabaco, ya que es la principal causa de EPOC,

tanto en individuos no deficitarios (113) como en DAAT, adelantando el debut unos 10 años (114).

1.6.1. Afectación hepática

La enfermedad hepática se asocia con la toxicidad provocada por los polímeros de la AAT, al quedar retenidos en el RE de los hepatocitos, causando la muerte celular (Fig. 9). La acumulación en los hepatocitos no es homogénea, debido a que no todos sintetizan AAT, ni en las mismas cantidades, con lo que algunos no presentan acúmulos intracelulares (115) y la presentación clínica de las hepatopatías relacionadas con el DAAT es muy variable.

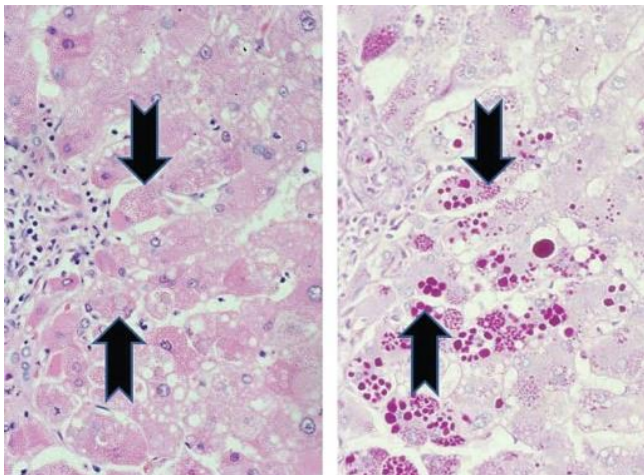


Figura 9. Microfotografía de hígado humano en un sujeto PiZZ. Tinción con hematoxilina eosina a la izquierda y con ácido periódico de Schiff a la derecha, mostrando las inclusiones (glóbulos) de polímeros de AAT mutante en el interior de algunos hepatocitos, señalados con flechas (115).

En la edad pediátrica, el DAAT es la causa genética más común de hepatopatía (108). En neonatos se manifiesta por colestasis intrahepática (ictericia obstructiva prolongada) en un 10%, secundaria al acúmulo de agregados de polímeros de la variante Z en el hepatocito. Al cabo de unos meses la ictericia puede desaparecer, aunque puede persistir durante años en un periodo denominado “luna de miel”, y muy raramente, continuar en la edad adulta. Un 2,5% puede evolucionar a cirrosis infanto-juvenil y requerir trasplante hepático (115).

En la época adulta, los pacientes con fenotipo PiZZ tienen un riesgo de desarrollar hepatopatía 20 veces mayor que los individuos PiMM (112). La incidencia de hepatopatía se incrementa con la edad: 10% por debajo de los 50 años y 20- 40% a partir de entonces. La frecuencia de hepatocarcinomas es de 2-3%, tanto en hígados cirróticos (26%) como en no-cirróticos. No siempre existe el antecedente de enfermedad hepática neonatal (115).

La exposición al virus de la hepatitis B y C, los procesos inflamatorios recurrentes o persistentes, los antiinflamatorios no esteroideos, el alcoholismo y otros hepatotóxicos, incrementan la acumulación de polímeros en los hepatocitos (115). También se han descrito mutaciones del gen de la manosidasa I asociadas con intenso daño hepático en pacientes con déficit grave (116).

En los heterocigotos es difícil calcular el riesgo de hepatopatía debido a que no existen estudios poblacionales con potencia suficiente, pero con los datos disponibles se ha estimado un riesgo (*Odds Ratio*, OR) que oscila entre 1,8 y 3,1, siendo mayor en los varones. Sin embargo, este riesgo es bajo, alrededor del 3%, en los sujetos PiMZ, comparado con el 30% de los PiZZ (112).

1.6.2. Afectación pulmonar

La afectación respiratoria en el DAAT se produce generalmente en pacientes con fenotipos PiZZ, PiSZ, alelos raros o nulos y debuta entre la tercera y quinta década de vida,. Así, los problemas respiratorios en el DAAT son propios del adulto, que mantiene una función pulmonar normal hasta los 30 años, y que no tiene manifestación clínica en la edad pediátrica. Sin embargo, algunos facultativos opinan que es una enfermedad que debería ser diagnosticada por el pediatra (117) y algunos pediatras incluyen la determinación de AAT siempre que solicitan en un niño un estudio analítico convencional. Es decir, el DAAT no provoca enfermedad pulmonar en la edad pediátrica pero la coexistencia de DAAT y otras enfermedades inflamatorias pulmonares podría acelerar el daño pulmonar., a la larga, podría ocasionar el DAAT (118). De cualquier modo, la detección precoz del DAAT permite adoptar medidas higiénico-ambientales y preventivas (control de la infección, dieta mediterránea, ejercicio físico y, sobre todo, evitar el hábito tabáquico, tanto activo como pasivo,...), lo que podría contribuir a reducir o retrasar el daño pulmonar.

Un estudio prospectivo de niños con DAAT, realizado en Suecia, muestra que no hay diferencias en la prevalencia de asma entre niños con DAAT y la población general (119, 120). Pero, aunque el asma no aumenta en el DAAT, estos pacientes son más propensos a desarrollar hiper-respuesta bronquial y a presentar una reducción de la función pulmonar (121) y, aunque es extraordinario, se han descrito casos aislados de niños, entre 7 y 13 años de edad, con clínica obstructiva y hallazgos histológicos de enfisema panacinar (122-124).⁶

La patología más frecuente relacionada con el déficit grave de AAT (niveles inferiores a 50 mg/dL o 11 μ M) es el enfisema, típicamente localizado en los

lóbulos inferiores del pulmón, aunque puede afectar a todas las áreas del pulmón (103). El enfisema se produce con el paso del tiempo, por una destrucción gradual y progresiva de los alveolos pulmonares; los pulmones aumentan de tamaño, se producen bullas (sacos de aire en los que no existe intercambio gaseoso) y los bronquios se estrechan, lo que dificulta la entrada de aire en los pulmones (125). Los síntomas de enfermedad pulmonar suele debutar alrededor de los 40-50 años en pacientes no fumadores, empezando unos 10 años antes en el caso de los fumadores (114). Además, el DAAT es el responsable del 2% de los casos de EPOC (126).

Los síntomas son similares a los de cualquier paciente con EPOC de cualquier etiología. El más frecuente es la disnea de esfuerzo, presente en el 70% de los casos registrados en nuestro país (127, 128). Otros síntomas son la tos y la expectoración crónica, presentes en alrededor de la mitad de los casos (128, 129).

El riesgo exacto del desarrollo del enfisema es desconocido. Un estudio reciente realizado en 237 individuos ZZ, muestra una OR mayor de dos en las variables: historia tabáquica, sexo masculino, neumonía y bronquitis crónica. Además, el haber sufrido asma en la infancia se asocia a una EPOC más grave, pero son datos que habría que tomar con cuidado, debido a que el número de pacientes con este antecedente es reducido en la muestra (130). Igualmente, se han identificado algunos genes que podrían estar influyendo en el desarrollo del enfisema como: NOS3 (131), GSTP1 (132), IL-10 (133), TNF- α (134), IREB2 y CHRNA3 (135)..

El riesgo de padecer enfisema en los individuos PiMZ es un tema controvertido. En ellos, los niveles de AAT se sitúan alrededor del 60%, con lo que estarían por encima del límite de protección. Sin embargo, un meta-análisis muestra que en

estudios casos-control el riesgo de EPOC está aumentado, cosa que no ocurre en las investigaciones transversales (136). Además, un estudio realizado con 4.376 sujetos, en el que se comparan individuos PiMM y PiMZ, muestra en estos últimos, una disminución de la capacidad pulmonar (137), lo que sugiere que la presencia del alelo PiZ incrementa el riesgo de padecer enfermedad pulmonar, llegando a ser alto en individuos homocigotos para el alelo PiZ.

De todos modos, hay que tener en cuenta que alrededor de un tercio de los individuos PiZZ son asintomáticos, en los que el déficit se descubre por estudios familiares o programas de cribado, y en los que su expectativa de vida y pronóstico no difiere de la población general. Por otra parte, existen factores asociados al mal pronóstico o progresión de la EPOC asociada al DAAT como consumo acumulado de tabaco, infecciones de repetición, la hiperreactividad bronquial, la exposición a otros tóxicos inhalados (130); de ahí la importancia adoptar medidas precoces de prevención.

1.6.3. Otras manifestaciones clínicas

El DAAT se puede asociar a vasculitis y paniculitis, con una incidencia mucho menor a la de enfermedad pulmonar y/o hepática.

La **vasculitis sistémica** se asocia con el alelo Z (fenotipos ZZ, SZ y MZ) y la mayoría cursa con auto-anticuerpos ANCA (anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos) positivos. Su prevalencia está incrementada unas 10 veces en pacientes con DAAT grave con respecto a la población general (138).

La **paniculitis** se observa también en los fenotipos ZZ y se manifiesta como áreas cutáneas necróticas, que espontáneamente supuran sin un trauma previo. Se estima una prevalencia de 1:100 en pacientes con DAAT grave (139). Puede ocurrir en cualquier zona de la piel, pero normalmente se localiza en los glúteos, tronco, extremidades y brazos. Histológicamente, los septos y lóbulos grasos están ampliamente alterados por inflamación con infiltración linfocítica (30). Un estudio reciente demuestra la presencia de Z-AAT en la piel, lo que respalda la patogénesis inflamatoria de la paniculitis y el potencial efecto pro-inflamatorio de los polímeros (140). Aunque no se contempla en ellas la terapia sustitutiva, se ha obtenido gran mejoría en casos aislados que han recibido este tratamiento (140, 141).

1.7. Diagnóstico

Ya hemos visto que en el DAAT existe una gran variabilidad genética y clínica. Ésto sumado al desconocimiento de esta patología por parte de algunos facultativos, hace que el DAAT sufra un gran problema de infradiagnóstico y retraso diagnóstico. Este capítulo está destinado a dilucidar cuándo y cómo hay que pensar en él, para poder detectarlo precozmente.

1.7.1. ¿Cuándo hay que sospechar un DAAT?

Las sociedades Torácica Americana (ATS, *American Thoracic Society*) y la Europea del Aparato Respiratorio (ERS, *European Respiratory Society*), han elaborado una

serie de recomendaciones para medir la cantidad sérica de AAT (tabla III), y advierten que todo individuo con concentraciones disminuidas debería ser sometido a segundas pruebas (fenotipado o genotipado) para su diagnóstico. Además, todos los individuos afectados de EPOC al menos una vez en la vida, los adultos y adolescentes con asma y todas las personas con historia familiar de DAAT deberían someterse a una cuantificación de la AAT sérica (142).

Tabla III: Recomendaciones para el diagnóstico del DAAT, modificado de ATS&ERS (142)

Recomendación tipo A: Prueba recomendada

- Adultos sintomáticos con patrón obstructivo pulmonar: Enfisema, EPOC o asma (con mala respuesta al tratamiento con broncodilatadores)
- Pacientes con hepatopatía de origen desconocido, incluyendo neonatos, niños y adultos

- Adultos con pancreatitis necrotizante

Recomendación tipo B: Prueba en discusión

- Adultos con bronquiectasias sin etiología evidente
- Adolescentes con obstrucción pulmonar persistente
- Individuos con obstrucción pulmonar persistente y sin factores de riesgo
- Adultos con vasculitis c-ANCA positiva

1.7.2. ¿Cómo se hace el diagnóstico?

El algoritmo diagnóstico se muestra en la figura 11. La primera prueba a realizar sería la **determinación sérica de AAT** mediante nefelometría. Esta técnica se basa en la formación de inmuno complejos insolubles entre la proteína y el anticuerpo anti-AAT (74). Para esta medición hay que tener en cuenta que, al ser la AAT una

proteína de fase aguda, su concentración puede aumentar durante los procesos inflamatorios o infecciosos, embarazo y consumo de anticonceptivos orales (16). Los fenotipos PiMM, PiMS, o PiSS, presentan concentraciones por encima del umbral de protección, mientras que el rango de concentración del fenotipo PiSZ atraviesa el límite, con lo que los sujetos pueden estar por encima o por debajo del umbral de protección. Los sujetos con fenotipo PiZZ siempre tienen una concentración de AAT sérica menor que la del umbral (Fig. 10).

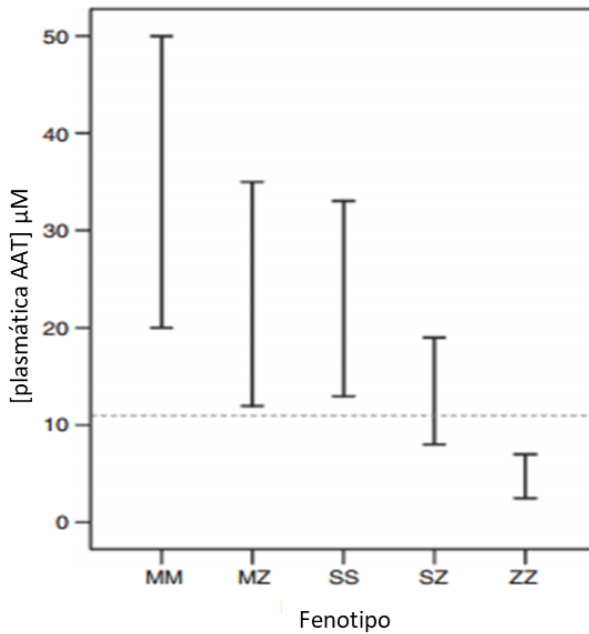


Figura 10. Concentración plasmática de AAT, en μM , en función del fenotipo. La línea discontinua representa el límite de protección. Modificado de Tonelli *et al.*, 2010 (143).

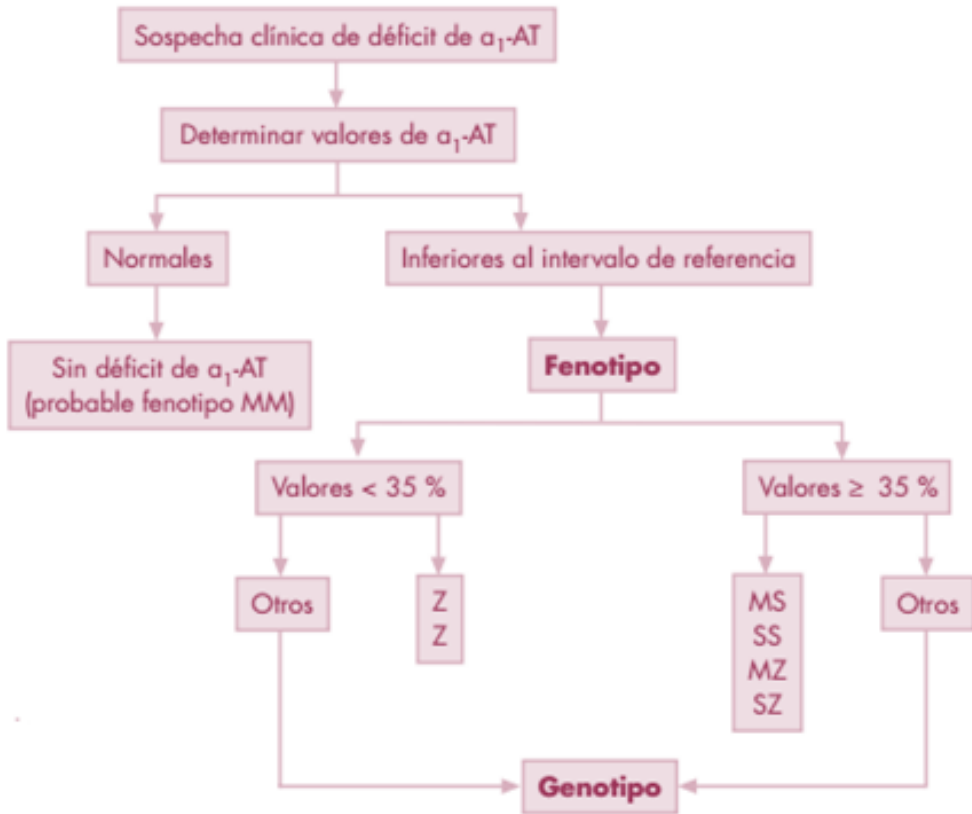


Figura 11. Algoritmo diagnóstico del DAAT modificado de Vidal *et al*, 2006. (78).

La identificación del fenotipo está indicada ante valores de AAT inferiores, o incluso cercanos al límite inferior de la normalidad (alrededor de 120 mg/dl), ya que podrían corresponder a los fenotipos PiMS, PiSS o PiMZ. Valores inferiores al 20% sugieren un fenotipo ZZ o nulo. Este **fenotipado** se realiza mediante una técnica de IEF, que separa electroforéticamente la proteína de acuerdo a su punto isoeléctrico en un gel de agarosa con un gradiente de pH de 4,2 a 4,9 (Fig. 12).

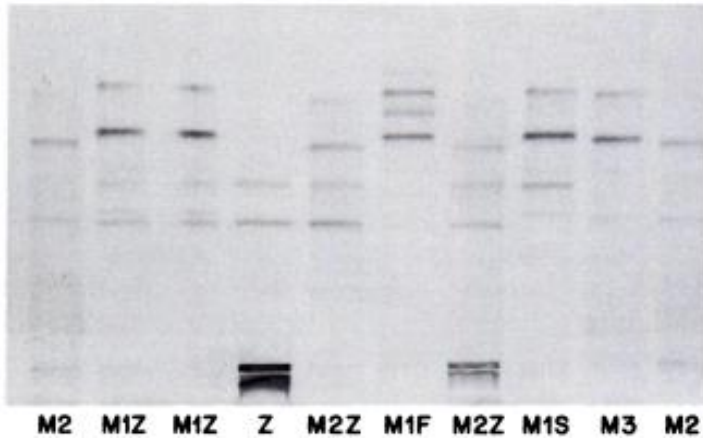


Figura 12. Muestra de diferentes fenotipos mediante IEF (144).

Esta técnica es muy útil para diferenciar los alelos deficitarios más frecuentes (S y Z), pero hay que tener en cuenta la existencia de alelos deficitarios “M like” (como Mmalton, Mpalermo, Mduarte,...), que tienen el punto isoeléctrico similar a los alelos normales PiM, por lo que no pueden ser discriminados mediante el IEF. Así, además de la nomenclatura Pi (*Proteinase inhibitor*) –que identifica la proteína-, se añade una nueva que identifica el gen, PI*. Esto permite diferenciar alelos diferentes que tienen el mismo patrón de migración electroforética y también alelos nulos, sin producción de proteína. Por ejemplo, en pacientes con bajos niveles plasmáticos de AAT en los que mediante IEF se observa sólo una banda en la zona Z, con lo que se señalaría como fenotipo PiZ, con las técnicas de genotipado se podría distinguir si este fenotipo PiZ es un PI*ZZ o PI*Z nulo.

El análisis molecular del gen de la AAT es el método de referencia cuando no existe relación entre la concentración de AAT y el fenotipo; permite la identificación de las variantes alélicas poco frecuentes y la caracterización de algunas variantes nuevas. El **genotipado** se realiza en el DNA de leucocitos aislados de sangre total.

Los alelos deficitarios más frecuentes, S y Z, se pueden identificar mediante métodos de PCR en tiempo real utilizando sondas específicas Taqman. Estas técnicas, alelo-específicas, son rápidas, fácilmente automatizables, de bajo coste, pero cubren parcialmente el gen, solo informan de la presencia o ausencia de los alelos estudiados, con lo que no se pueden identificar variables nuevas y se necesita saber exactamente las mutaciones candidatas para obtener sus *primers* específicos. Si aun así no se ha encontrado la mutación causante del déficit, se procede al genotipado del gen completo.

1.8. Tratamiento

El tratamiento específico del DAAT sólo se plantea en pacientes con déficit grave y enfisema pulmonar, no existiendo tratamiento específico para la patología hepática, ni para otras manifestaciones clínicas –vasculitis y paniculitis-. El tratamiento consiste en la administración intravenosa de AAT aislada del plasma humano de voluntarios sanos PiMM, junto a la aplicación de las medidas farmacológicas y no farmacológicas utilizadas en pacientes con EPOC sin déficit. En la figura 13 se muestra un esquema de los posibles tratamientos para el DAAT. Los tratamientos que a día de hoy están disponibles, se muestran con fondo blanco, mientras otros posibles tratamientos están siendo investigados.



Figura 13. Esquema de los potenciales tratamientos para el DAAT. Modificado de Tonelli *et al.*, 2010 (143).

1.8.1. Tratamiento respiratorio

En 1981, Gadek *et al.*, demostraron por primera vez que la administración semanal de AAT exógena normalizaba los niveles plasmáticos y re-establecía la actividad antielastasa a nivel pulmonar (145).

En 1987, la *Food and Drug Administration* aprobó el uso de AAT procedente del plasma de donantes para el tratamiento sustitutivo intravenoso. Tras varios estudios, se demostró que la infusión de AAT conseguía concentraciones elevadas de la proteína en el suero y líquido broncoalveolar, así como un aumento significativo y paralelo de la actividad antielastasa en ambos fluidos (146), a pesar de lo cual su efectividad ha sido un tema en discusión en el ámbito neumológico.

En nuestro país el tratamiento sustitutivo está aprobado y sus indicaciones se muestran en la tabla IV (147). Estudios farmacocinéticos concluyen que dosis de 120 mg/kg, a intervalos de 15 días, mantienen valores protectores durante el 100% del tiempo (148).

Tabla IV: Criterios del REDAAT para tratamiento con AAT intravenosa, modificado de Casas *et al.*, 2015 (147).

- 1. Mayores de 18 años**
- 2. DAAT demostrado por concentraciones séricas ≤ 50 mg/dl**
- 3. No fumadores o ex fumadores al menos durante los últimos 6 meses**
- 4. Enfisema pulmonar demostrado por pruebas de función pulmonar y/o TCAR de tórax**
- 5. EPOC con $FEV_1 < 80\%$ del predicho, que reciben tratamiento que reciben tratamiento farmacológico y no farmacológico óptimo**
- 6. Que no presenten un déficit de inmunoglobulina A (IgA)**
- 7. Que estén dispuestos a recibir regularmente el tratamiento en hospital de día**

Se deben cumplir todos los criterios. El tratamiento con AAT intravenosa no debe ser interrumpido en un paciente ya tratado si su función pulmonar se deteriora y/o su FEV_1 cae por debajo del 25%.

El tratamiento sustitutivo no se administra a pacientes heterocigotos PiMZ, ya que en ellos, la concentración sérica está por encima de la protectora (50 mg/dL). Algunos individuos PiSZ con concentraciones séricas por debajo de las protectoras podrían recibir este tratamiento.

La administración de AAT, en general, es bien tolerada y segura. La única contraindicación se da en pacientes con déficit de IgA, puesto que -al ser un producto purificado- puede contener pequeñas trazas de esta inmunoglobulina pudiendo causar reacciones de hipersensibilidad. Por el mismo motivo, existe un

riesgo teórico de transmisión de agentes infecciosos como virus y priones, aunque todavía no se ha descrito ningún caso de infección (37).

1.8.2. Tratamiento hepático

La enfermedad hepática relacionada con el DAAT no tiene un tratamiento específico, centrándose únicamente en la prevención de las complicaciones. Se recomienda la vacunación contra la hepatitis A y B, ya que esta infección podría incrementar el riesgo de enfermedad hepática. Cuando el desarrollo de la enfermedad amenaza la vida del paciente, se indica el trasplante de hígado, lo que termina con el daño hepático y supuestamente también con el pulmonar, ya que el órgano trasplantado produce M-AAT (112).

Estudios experimentales de enfermedad hepática por DAAT en modelos animales, muestran que los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son tóxicos, ya que incrementan la síntesis de la proteína mutante, aumentando por tanto su acumulación intrahepática con el consiguiente perjuicio (149) Así que, aunque no se dispone de estudios en humanos, parece razonable limitar el consumo de AINES en los pacientes PiZZ.

Por otra parte, se han probado otras estrategias para evitar la polimerización intrahepática, como el uso de diversas chaperonas. Los estudios *in vitro* y con modelos animales eran muy esperanzadores (150), pero en humanos no solo no han funcionado, sino que han causado múltiples efectos adversos (151). Otra estrategia para evitar la formación de polímeros sería la utilización de pequeñas moléculas peptídicas sintéticas análogas al sitio activo de la AAT, evitando así la

inserción del centro activo de la Z-AAT en las láminas de otras (152). Sin embargo, aún se está investigando cómo introducir con precisión las moléculas en el RE de los hepatocitos.

2. Introducción: microRNAs

2.1. Historia de los microRNAs

Los microRNAs, también denominados miRNA o miR, son pequeñas moléculas de RNA no codificante que regulan procesos celulares. Esta regulación se produce mediante inhibición de la traducción o degradación de RNA mensajero (RNAm).

El primer miRNA se identificó en 1993, en *Caenorhabditis elegans*. Fue denominado lin-4 y se demostró que actuaba regulando negativamente, es decir, disminuyendo el nivel proteico de LIN-14, controlando así su desarrollo post-embrionario. Su mecanismo de acción consiste en el alineamiento con el RNAm diana, con lo que evita la traducción (153). Años después se demostró que let-7 era un RNA de 21 nucleótidos, complementario a regiones 3'UTR (*3' UnTranslated Region*) y que también jugaba un papel en la regulación del desarrollo embrionario de *C. elegans* (154). Estos fueron los primeros hallazgos de un nuevo nivel de regulación génica, llevado a cabo por estas pequeñas moléculas de ácido nucléico no codificante, denominadas microRNAs.

Hasta el año 2000, se pensaba que este nuevo nivel de regulación era exclusivo de los nemátodos, hasta que en ese año, Pasquinelli *et al.* demostraron que let-7 estaba muy conservado en un amplio rango de especies, desde moscas hasta humanos (155).

En 2004, Doench y Sharp estudiaron las pautas de interacción entre los miRNA-RNAm usando análisis mutacional. Encontraron que los ocho primeros nucleótidos en la región de 5' del miRNA, son los principales responsables de la especificidad y actividad. Estos ocho nucleótidos reciben el nombre de “semilla” y es lo que impulsa la interacción RNAm diana. Este principio constituyó la base de predicción de las dianas de los miRNAs (156).

Por otra parte, predicciones bio-informáticas sugerían que los miRNAs poseían múltiples dianas. El primer experimento que confirmó esta hipótesis se realizó en 2005 utilizando *microarrays* de expresión, demostrando que los miR-1 y miR-124 reprimían cada uno, alrededor de 100 RNAm diana (157).

2.2. Biogénesis de los microRNAs

La mayoría de los microRNAs se producen mediante la ruta canónica que es la más conocida, aunque últimamente se han descrito nuevas rutas, incluyendo varias independientes de las enzimas Drosha y Dicer, que son clave en la maduración de estas moléculas. En la figura 14 se representa un esquema de las diferentes rutas de biogénesis de los microRNAs, y la tabla V se muestra un resumen de las características de las diferentes rutas

Tabla V: Características de las diferentes rutas biosintéticas de microRNAs.

| Ruta biosintética | Drosha | Dicer | Otras enzimas implicadas | Mono/ policistrónicos |
|-------------------|---------------|---------------|--------------------------|---|
| Ruta canónica | Dependiente | Dependiente | - | Mono o policistrónicos (<i>cluster</i>) |
| miRtrons | Independiente | Dependiente | <i>Splicing</i> | monocistrónicos |
| Simtrons | Dependiente | independiente | | monocistrónicos |
| miR-320 y 484 | Independiente | Dependiente | - | monocistrónicos |
| snoRNA | Independiente | Dependiente | | monocistrónicos |
| Endo-siRNA | Independiente | Dependiente | | monocistrónicos |

| | | | | |
|----------|---------------|-----------------------------|---------|-----------------|
| Pre-tRNA | Independiente | Dependiente o independiente | Z-tRNAs | monocistrónicos |
| miR-451 | Dependiente | Independiente | - | Policistrónico |

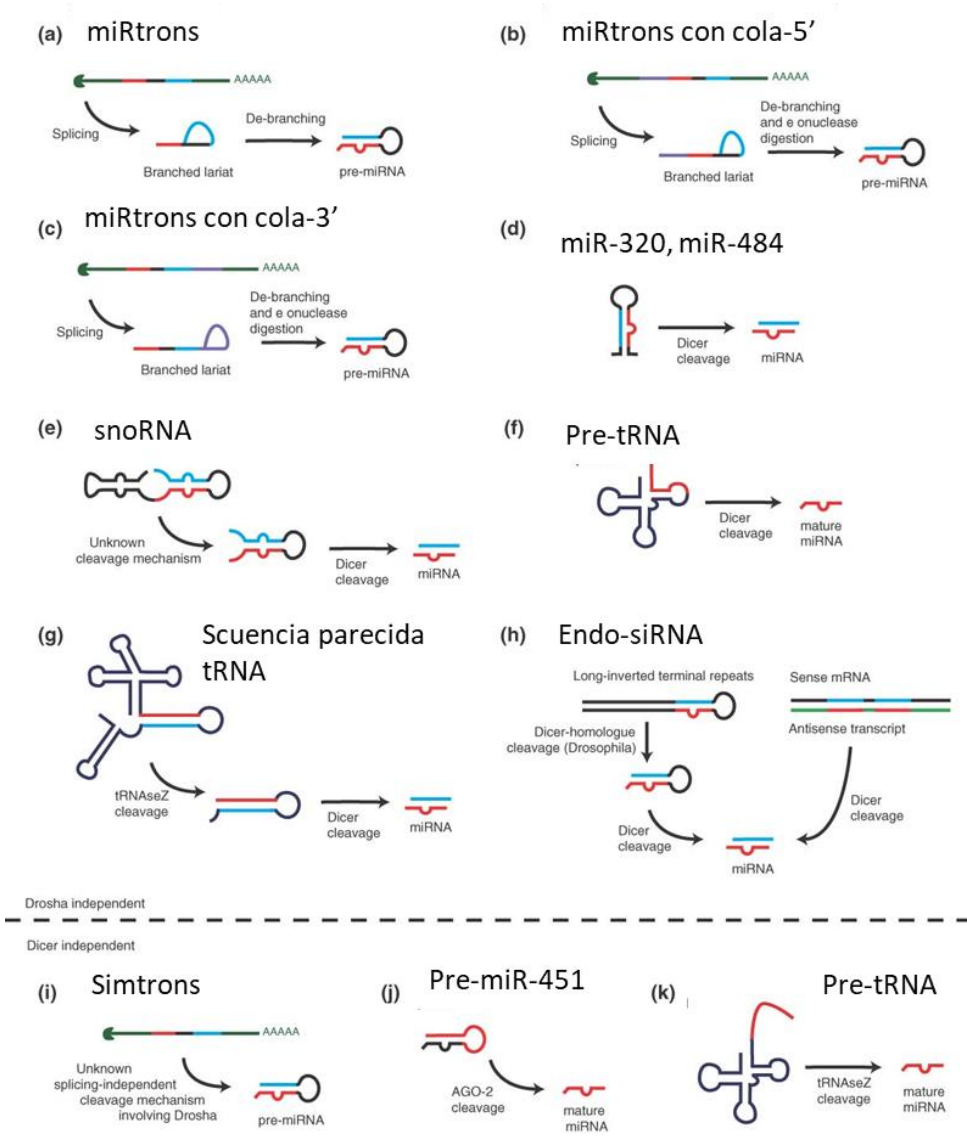


Figura 14. Rutas atípicas de biogénesis de los microRNAs. Modificada de Curtis *et al.*, 2012 (158).

2.2.1. La ruta canónica

Los microRNAs son típicamente transcritos por la RNA polimerasa II como un transcrito largo denominado pri-miRNA (*primary miRNA transcript*) que posee una cabeza y una cola poli-A. Los pri-miRNAs poseen un tronco de doble hélice, de alrededor de 30 pares de bases, una horquilla terminal y dos extremos de cadena simple (159).

Existen varios genes de miRNAs organizados en *clusters*; los pri-miRNAs derivados de ellos pueden ser monocistrónicos o policistrónicos (160). Dentro del núcleo estos pri-miRNA son procesados, eliminando los extremos de cadena simple y quedando una estructura de horquilla de entre 70-90nt, llamada pre-miRNA (precursor miRNA) (161). Este procesamiento se lleva a cabo por el complejo Microprocesador, compuesto por la enzima Drosha RNAsa (ribonucleasa) II y DGCR8 (*Di George syndrome critical region 8 gene*), una proteína de unión a la doble cadena de RNA (159).

Los pre-mi-RNAs son translocados al citoplasma por un complejo formado por la Exportina 5 y la RAN-GTP. Ya en el citoplasma, el pre-miRNA es cortado por la Dicer, una RNAsa III, generando un dúplex maduro de miRNA (ds-miRNA). Este dúplex no es plenamente complementario, posee algunos *mismatches* y cada hebra suele tener un saliente de 2 nt en su extremo 3' (160). El ds-miRNA se une a la proteína Argonata (AGO2 en mamíferos), que es el efector de RISC (Complejo silenciador inducido por RNA, *RNA-Induced silencing complex* en inglés), separa el dúplex y dependiendo de la estabilidad termodinámica, selecciona la hebra guía, lo que proporcionará el miRNA maduro, mientras normalmente la otra hebra es degradada (162). El miR maduro, como parte del RISC, se une a la región 3'UTR del

RNAm diana y, dependiendo de su complementariedad, provoca su degradación, desestabilización o inhibición de la traducción (160). Un esquema del procesamiento de la ruta canónica de los microRNAs se muestra en la figura 15.

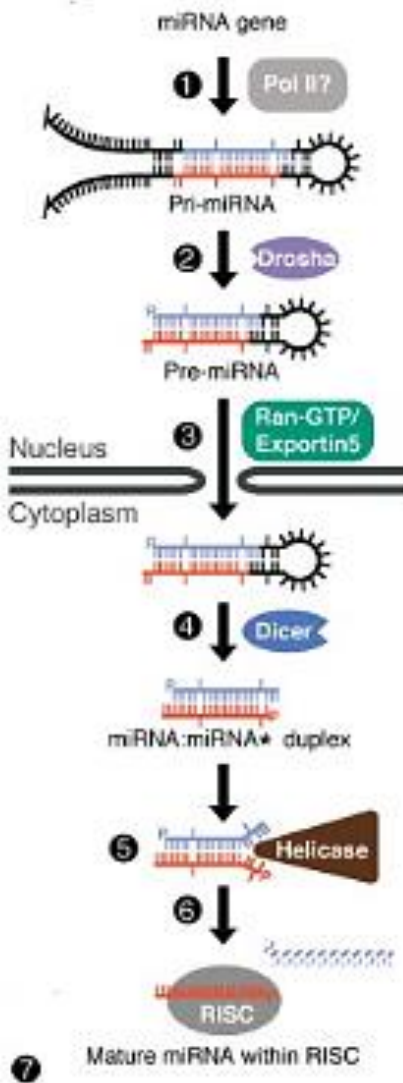


Figura 15. Esquema del procesamiento de la ruta canónica de los microRNAs (163).

2.2.2. **miRtrons**

Los primeros miRtrons fueron identificados por Ruby *et al.* mientras examinaban datos de cortas secuencias de RNA en la *Drosophila* (164), y la primera evidencia en los mamíferos la encontraron Berezikov *et al.* usando estrategias computacionales y experimentales (165).

Los miRtrons son un subtipo de microRNAs generados en los intrones de genes codificantes de proteínas mediante la maquinaria de *splicing* e independiente de la Drosha (164), pero dependientes de la Dicer (Fig. 14a). Esta ruta crea entre el 1% y 2% de todos los microRNAs humanos (158). El pre-miRNA que se forma a través de la ruta miRtron está fosforilado en el extremo 5' e hidroxilado en el 3', al igual que los que se forman mediante la ruta canónica, con lo que el procesamiento del pre-miRNA continúa a través de la ruta canónica. Los miRtrons maduros suelen provenir del extremo 3' de la horquilla, a diferencia de los que proceden de la ruta canónica que suelen provenir del extremo 5' (164). Además, hay otro subtipo de **miRtrons** que tiene una **cola** de alrededor de 100nt en cualquiera de sus extremos (Fig. 14b y c), predominando -en los mamíferos- los de la cola en el extremo 5' (166). Asimismo, en el ser humano existen dos miRtrons (miR-1225 y miR-1228), que se producen de manera independiente al *splicing*; se denominan **simtrons** (splicing-independiente miRtrons) (167) (Fig. 14i) y están localizados en los intrones cortos donde los nucleótidos terminales de la horquilla del pre-microRNA corresponden a los extremos 3' y 5' del sitio del *splicing* (158). En la figura 16 se muestran 3 ejemplos de diferentes microRNAs (158).

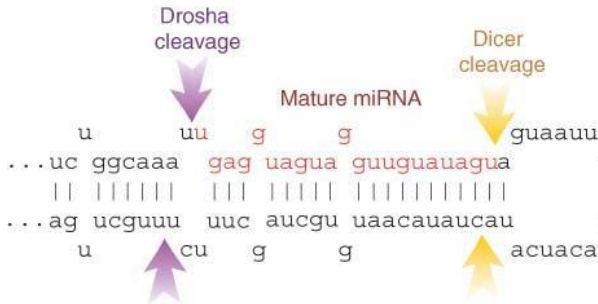
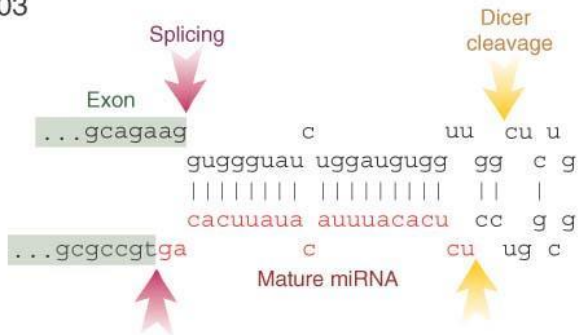
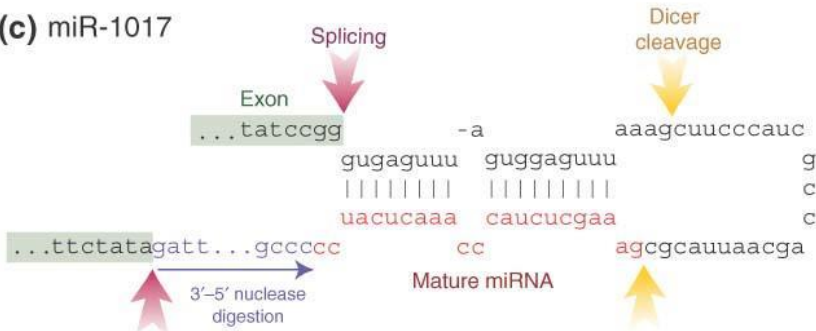
(a) let-7**(b) miR-1003****(c) miR-1017**

Figura 16. Ejemplos de microRNAs de *Drosophila melanogaster*. a) let-7, microRNA proveniente de la ruta canónica. El transcrito primario contiene unas colas que son cortadas por Drosha para producir el pre-miRNA. Después, la región horquilla es cortada por Dicer y la hebra madura de miRNA se incorpora al RISC. b) miR-1003, miRtron. En el proceso de *splicing* se produce el mensajero funcional y un pre-miRNA en forma de horquilla que es cortado por Dicer. c) miR-1017, mirtron con cola. El pre-miRNA producido en el proceso de *splicing* contiene una cola de alrededor de 100nt en el extremo 3', que es digerida por una exonucleasa (158).

2.2.3. miR-320 y 484

Las secuencias de los pri-miRNAs 320 y 484 no poseen las características que reconoce la enzima Drosha, con lo que escapan a su procesamiento. Estas horquillas son directamente cortadas por la Dicer que libera los microRNAs maduros (158) (Fig. 14d)

2.2.4. snoRNA

Algunos RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), también producen pre-miRNAs independientemente del microprocesador (168) (Fig. 14e). Estos snoRNAs son RNAs de cadena larga, de entre 70 y 200 nt, están altamente conservados evolutivamente y funcionan como complejos de ribonucleoproteína pequeña nucleolar (snoRNP, en inglés), guiando la modificación enzimática de los nucleótidos del RNA ribosómico (169). La transformación de estos snoRNAs en miRNAs requiere actividad Dicer, pero es independiente de la Drosha (170).

2.2.5. Endo-siRNA

Los siRNAs endógenos (endo-siRNA) son pequeños RNAs derivados, de doble cadena, largos y endógenos (170). Algunos endo-siRNA se unen a AGO2, la subunidad catalítica del RISC, reprimiendo la traducción (171) (Fig. 14h). Estos endo-siRNAs se pueden producir por tres mecanismos diferentes: a) transcripción de repeticiones invertidas que producen una horquilla de RNA dúplex por la acción de Dicer; b) transcripción de fragmentos cortos de ambas hebras de DNA

genómico, produciendo un cis-endo-siRNA que forma un DNA dúplex de doble cadena; y c) transcripción de dos *loci* genómicos produciendo fragmentos de RNA que hibridan para formar un trans-endo-siRNA, RNA dúplex de doble cadena. Al menos, algunos de estos RNAs parecen tener una función comparable con los microRNAs producidos por la ruta canónica, uniéndose al RNAm cuando el emparejamiento es perfecto. Por otra parte, algunos endo-siRNAs juegan un papel en la regulación de la cromatina y silenciamiento de elementos transponibles, pudiendo también actuar como silenciadores cotranscripcionales en la expresión génica (160).

2.2.6. Pre-tRNA

Existen 3 diferentes rutas de biogénesis de los microRNAs a partir de los pre-tRNAs, dos Z-dependientes y una Z-independiente. Los miRNAs codificados por γ -herpesvirus murino (MHV68) se transcriben a través de la RNA polimerasa III produciendo un pri-miRNA que consiste en un tRNA unido a la horquilla pre-miRNA (Fig. 14g). Estos pri-miRNAs no necesitan a la enzima Drosha, en cambio, se procesan mediante la Z-tRNAsa (también conocida como ELAC y 3' tRNAsa), que segmenta el extremo 3' del tRNA para liberar las horquillas de pre-miRNA, que luego son procesadas por la Dicer (170). Se cree que la Z-tRNAsa está localizada en el núcleo (172); así, esta vía de biogénesis probablemente converge en el núcleo con la vía canónica durante la exportación de la horquilla. Por otra parte, estructuras secundarias de la tRNA pueden ser procesadas por la Dicer para liberar cortas moléculas de RNA de su extremo 3', de manera independiente de la Z-tRNAsa (Fig. 14h). Además, este procesamiento se puede producir

independientemente de la enzima Dicer, y entonces la escisión la realiza la Z-tRNAsa, también en el extremo 3' (158) (Fig. 14k).

2.2.7. miR-451

El miR-451 es un microRNA eritropoyético, altamente conservado en los vertebrados y su biogénesis es independiente de la enzima Dicer (173). Los pre-miR-451 y pre-mir-144 se transcriben en un pri-miRNA policistrónico que es procesado por la Drosha (160), aunque el pre-microRNA resultante sólo tiene 17 pares de bases, no es reconocido por la Dicer, y es directamente procesado por la AGO2 (166) (Fig. 14j).

2.3. Mecanismo de acción de los microRNAs

Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante, de entre 19 a 25 nt, que disminuyen la expresión génica. Las predicciones utilizando herramientas bioinformáticas indican que los miRNAs podrían regular alrededor del 60% de los genes codificantes de proteínas en los seres humanos (174); además se estima que existen más de 1.000 miRNAs codificados en el genoma humano, que cada uno de ellos puede actuar en más de un RNAm diana y que un RNAm puede tener más de un miRNA que lo inhiba, dando lugar a una mayor inhibición (175) (Fig. 17).

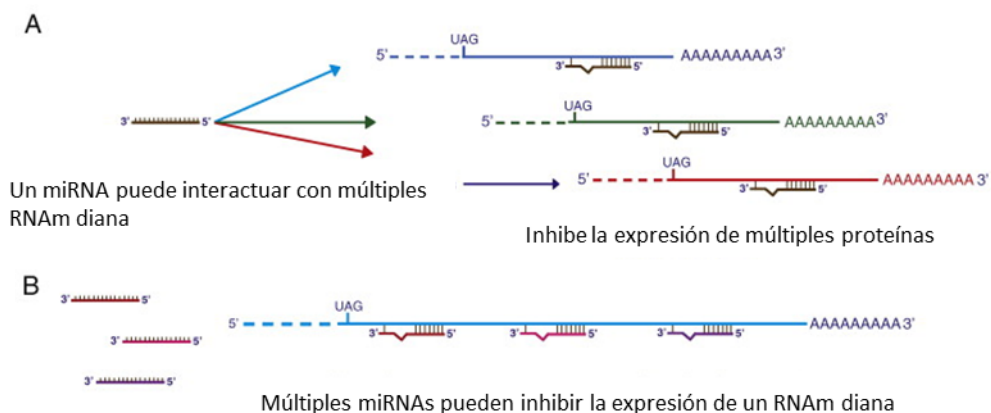


Figura 17. Representación esquemática que muestra que: (A) un microRNA puede tener varios RNAm diana, y (B) un RNAm puede ser reprimido por múltiples miRNAs. Modificado de Elton *et al.*, 2011 (175).

Los microRNAs maduros reconocen su diana mediante emparejamiento de bases entre el RNAm y la “semilla” del microRNA, que es la región más evolutivamente conservada. La semilla del microRNA se encuentra localizada en las posiciones 2 a 9, del extremo 5' del miRNA, que tradicionalmente se une a la región 3' UTR del RNAm diana (156). A pesar de la importancia de la región de semilla, el extremo 3' de los miRNAs también contribuye a la unión eficaz en, aproximadamente, el 2% de todos las regiones conservadas. Además, algunos de los sitios diana de los microRNA validados no poseen un apareamiento completo con la semilla y, en su lugar, se pueden aparear entre los nt 10-12 de la región central de miRNA (176) (Fig. 18). Por otra parte, también se ha demostrado que los microRNAs se pueden unir a la región 5'UTR (177), ORFs (178) y a regiones promotoras (179).

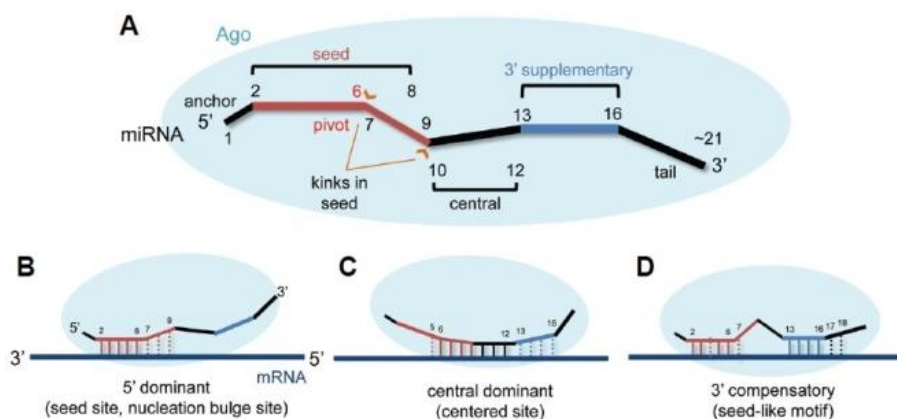


Figura 18. Formas de reconocimiento de los miRNA-RNA(180).

Dependiendo del microRNA, RNA diana y contexto celular, la interacción puede llevar a una represión de la traducción, degradación del RNA o a una mezcla de las dos.

A continuación se muestran las conclusiones derivadas de un estudio en el que se revisó la interacción entre miRNA-RNA, en ratones genéticamente modificados. El 48% de los genes diana están predominantemente regulados mediante una inhibición de la traducción; el 29% fundamentalmente lo están mediante degradación del mRNA, y el 23%, por ambos mecanismos. (181).

Casi todos los RNA diana identificados en el desarrollo celular o tisular, están principalmente regulados mediante la degradación del RNA. Este mecanismo elimina el RNA de forma irreversible y proporciona un modo eficiente para determinar la diferenciación específica de la célula. Sin embargo, en células totalmente diferenciadas, la forma predominante de regulación de los microRNAs es la inhibición de la traducción, que es un mecanismo inmediato, transitorio y reversible, más adaptado a contrarrestar estrés ambiental (181).

2.4. Nomenclatura de los microRNAs

Los criterios para determinar la nomenclatura de los microRNAs, se han extraído de la base de datos miRbase (182).

La numeración de los miRNAs es secuencial aunque, cuando se descubren miRNAs ortólogos en nuevas especies, se suelen denominar con el mismo número. Las tres primeras letras de los microRNAs están destinadas al reconocimiento del organismo al que pertenece [ej.: hsa-miR-121, *Homo sapiens* miR-121]. El miRNA maduro se denomina miR-121, mientras que el mir-121 se refiere al gen del miRNA y también al transcrito primario en forma de horquilla.

Distintas secuencias precursoras que expresan secuencias maduras idénticas se identifican con un sufijo numérico [ej.: hsa-mir-121-1 y hsa-mir-121-2], mientras que los sufijos con letras indican secuencias maduras estrechamente relacionadas [ej.: hsa-miR-121a y hsa-miR-121b].

Cuando se sabe claramente cuál es el miRNA que se expresa predominantemente, se le denomina “hebra guía” [ej.: miR-121] y al brazo opuesto “estrella” [ej.: miR-121*]. Pero cuando los datos no son suficientes para determinar qué secuencia es la predominante, se nombran según el brazo de procedencia [ej.: miR-121-5p (del brazo 5') y miR-121-3p (del brazo 3')].

Sin embargo, hay algunas excepciones a estas reglas. Por ejemplo, en las plantas, estas moléculas se denominan en mayúsculas [ej.: MIR121]. Además, let-7 y lin-4 no siguen estas reglas que conservan estos nombres por razones históricas. Las nuevas presentaciones de homólogos de let-7 o lin-4 también adquieren estos nombres.

2.5. microRNAs circulantes

Las moléculas de microRNA se producen y actúan intracelularmente pero, además, se pueden encontrar en el entorno extracelular, sobretodo en el suero, plasma y orina (183). Estos microRNAs conforman un grupo diverso, pueden estar encapsulados en **cuerpos apoptóticos**, **exosomas**, en **micro-vesículas** de lipoproteínas de alta densidad o unidos a **proteínas AGO** (184). Alrededor del 90-95% de los microRNAs circulantes están unidos a estas proteínas AGO (185) (Fig. 19).

La población de microRNAs circulantes procede de diferentes tipos celulares como células sanguíneas, endoteliales, hepáticas, musculares, cardíacas,...(186, 187). Esta transferencia al torrente sanguíneo ocurre en órganos que están altamente vascularizados como riñones, hígado, cerebro, pulmones e incluso tumores (183) y su cantidad varía en condiciones patogénicas (188).

El significado biológico de los miRNAs secretados al medio extracelular aún no se ha determinado. Una hipótesis propone que las células las secreten para eliminar el RNA no deseado, por ejemplo, después de inhibir la expresión del RNAm diana, el miARN no utilizado puede volverse redundante y eliminarse en exosomas. Por otro lado, la secreción de los microRNAs en vesículas podría ser parte de un sistema para la comunicación intercelular. Sin embargo, esos dos fenómenos no son excluyentes, y ambos pueden coexistir (189).

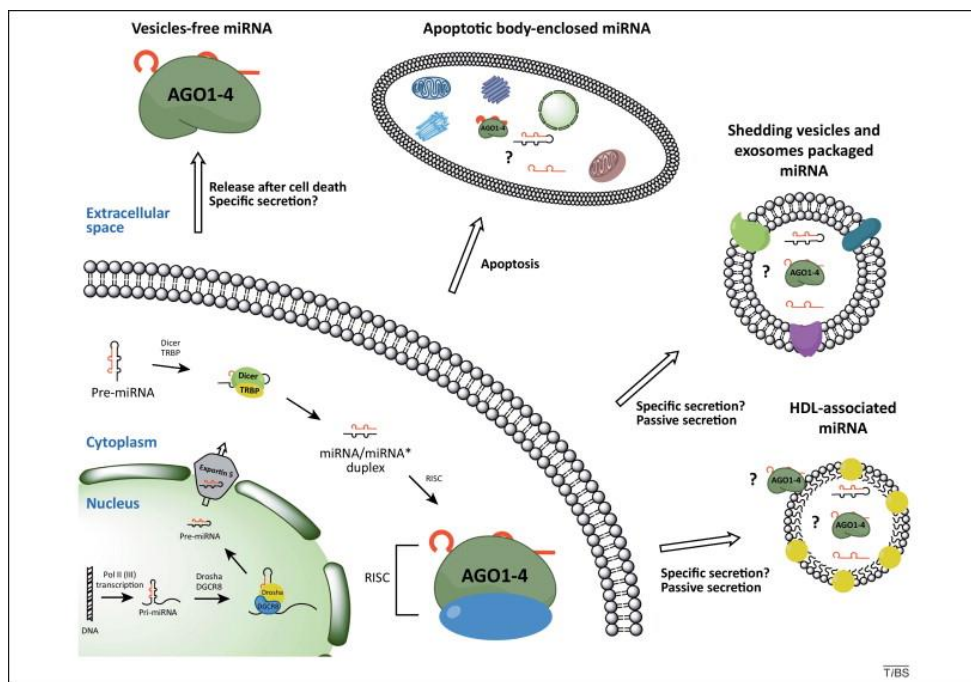


Figura 19. Mecanismos por los que los microRNAs llegan a la circulación (184).

Un **biomarcador** ideal debe poder obtenerse con **métodos no invasivos**, ser **económico, específico** para la enfermedad o proceso patogénico, traducible desde modelos a seres humanos y de **temprana detección** antes de que aparezcan los síntomas clínicos (190), características que cumplen a la perfección los microRNAs circulantes.

Los miRNA circulantes han mostrado ser extremadamente estables: resistentes a altas dosis de RNAsas, ciclos de congelación-descongelación y fluctuaciones significativas en el pH (189); esto es debido a su pequeño tamaño que los hace más estables y menos propensos a la degradación y a la unión a las proteínas AGO (183).

2.6. Desequilibrio de los microRNAs en enfermedades pulmonares y hepáticas

Como ya se ha explicado, se está abriendo un nuevo campo de investigación en la utilización de los microRNAs circulantes como biomarcadores para el diagnóstico temprano de procesos patológicos. En esta sección se resumen varios estudios que identifican un desequilibrio de microRNAs en enfermedades hepáticas y pulmonares.

2.6.1. microRNAs circulantes en hepatopatías

Existen diferentes estudios que coinciden en el uso del miR-122 como biomarcador de hígado graso no alcohólico y de esteatosis hepática no alcohólica. Miyaaki *et al.* observan una correlación positiva entre el miR-122 y la gravedad del hígado graso no alcohólico y una correlación negativa entre este miR y la gravedad de la fibrosis hepática (191), al igual que Pirola *et al.* que aprecian un incremento de 7,2 veces del miR-122 y de 4,4 del miR-192 en los pacientes con hígado graso no alcohólico respecto a los controles (192). Además, en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica, Becker *et al.* confirman un incremento de los microRNAs circulantes miR-122, miR-192 y miR-21 (193).

Por otro lado, Tan *et al.* encuentran una firma de miRNAs séricos que consta de miR-122-5p, miR-1290, miR-27b-5p y miR-192-5p, en pacientes con cirrosis biliar

primaria (194). Del mismo modo, Ninomiya *et al.* perciben una disminución de los niveles circulantes de miR-505-3, 197-3p y 500a-3p, en pacientes con cirrosis biliar primaria comparados con controles sanos, y una menor expresión de los miR-505-3p, 139-5 p y 197-3p en comparación con el grupo de hepatitis viral (195).

Además, tal y como parece mostrar un reciente estudio de Yan *et al.*, la regeneración, al menos en ratones, se refleja en los microRNAs circulantes, por un incremento sérico de los miR-1A y miR-18 (196).

2.6.2. microRNAs circulantes en patologías respiratorias

Se han encontrado estudios que relacionan algunas patologías respiratorias con un desequilibrio de los microRNAs circulantes. En el caso de la EPOC, los resultados son variables debido a los diferentes diseños de los experimentos. Por ejemplo, mientras en un estudio comparando suero de pacientes con EPOC y de fumadores sanos se encontraron 4 microRNAs infraexpresados (miR-20a, miR-28-3p, miR-34c-5p y miR-100) y el miR-7 sobreexpresado (197), en otro, realizado en plasma por Sanfioenzo *et al.*, en el que se incluían 3 grupos diferentes (EPOC, carcinoma pulmonar no microcítico y controles), hallaron una sobre-expresión de los miR 155-5p, 199a-5p, 191-5p y 145-5p y una infra-expresión de los miR 20a-5p, 126-3p y let-7f-5p, en los pacientes con EPOC comparados con los individuos sanos (198).

El asma y la EPOC se caracterizan por una obstrucción de las vías aéreas, por lo que Wang *et al.* plantearon un estudio comparando los microRNAs plasmáticos en pacientes con estas enfermedades y en controles sanos. Observaron diferencias en

la expresión de miR-145-5p, miR-338-4p y miR-3620-3p en los pacientes con EPOC respecto a los controles y pacientes con asma. Además, realizaron un análisis funcional viendo que estos microRNAs están implicados en la inflamación, regulación de la proliferación y diferenciación celular, y en el estrés oxidativo (199).

Asimismo, dos estudios recientes, detectan un incremento del miR-21 en el suero de niños con asma (200, 201).

Por ello, para poder establecer una firma genética fiable de diagnóstico/pronóstico en enfermedades como la EPOC, primero se realizan estudios exploratorios, como los señalados anteriormente, para encontrar un patrón de expresión diferencial, de uno a más microRNAs; después sería conveniente realizar un análisis funcional, para identificar los mecanismos celulares que están implicados y, por último, es necesario realizar un estudio de validación de los microRNAs candidatos con un tamaño muestral mayor (tabla VI).

Tabla VI: Propuesta de los microRNAs circulantes como biomarcadores, modificado de Pattarayan *et al.* (202).

| miRNA | Modelo y Regulación | Muestras | Referencias |
|-----------------------|---------------------|--|----------------|
| miRNAs no específicos | | | |
| miR-21 | FPI, EPOC y asma ↑ | Suero y plasma | (200-206) |
| Let-7d | FPI, EPOC y asma ↓ | Suero, plasma, linfocitos y LBA (exoxomas) | (205, 207-210) |
| miR-150 | EPOC, asma ↑ | Plasma | (207, 211) |

| | | | |
|---|----------------|---------------------------------------|----------------|
| miR-492 | EPOC, asma ↑ | Sangre y linfocitos | (208, 212) |
| Let-7a | FPI, asma ↓ | Suero, linfocitos y LBA (exosomas) | (205, 208-210) |
| 145-5p y miR-338-3p | Asma ↑, EPOC ↓ | Plasma | (199) |
| miR-3620-3p | Asma ↓, EPOC ↑ | Plasma | (199) |
| miR específicos | | | |
| miR-320 | LPA ↑ | Sangre | (213) |
| miR-214 | LPA ↓ | Sangre | (213) |
| miR-6375-3p, miR-1229, miR-18b-3p | FPI ↑ | Suero | (203) |
| miR-3652, miR-557, miR-150-5p | FPI ↓ | Suero | (203) |
| miR-132 | EPOC ↑ | Plasma y LBA | (207, 214) |
| miR-34 | EPOC ↓ | Espuito y LBA | (214, 215) |
| miR-155-5p, 199a-5p, 191-5p y 145-5p | EPOC ↑ | Plasma | (198) |
| miR-20a-5p, 126-3p y let-7f-5p | EPOC ↓ | Plasma | (198) |
| miR-20a, miR-28-3p, miR-34c-5p y miR-100 | EPOC ↓ | Suero | (197) |
| miR-7 | EPOC ↑ | Suero | (197) |
| miR-665 | Asma ↑ | Linfocitos y LBA (exosomas) | (208, 210) |
| miR-26a | Asma ↓ | Suero y LBA (exosomas) | (209, 210) |

FPI: Fibrosis pulmonar idiopática; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; LPA: Lesión Pulmonar Aguda; LBA: Lavado Bronco-Alveolar.

Todos estos estudios han identificado un patrón de microRNAs circulantes diferente al de individuos controles, que parece reflejar lo que está ocurriendo a nivel intracelular en el órgano afecto, así que se podría conseguir una firma genética de microRNAs que sirva como biomarcador de estas enfermedades

.

3. Justificación del estudio, hipótesis y objetivos

3.1. Justificación del estudio

Como ya se ha explicado, existe una gran variabilidad genética y una gran heterogeneidad clínica en el DAAT, aunque se sabe que determinados fenotipos y factores ambientales incrementan el riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar o hepática grave. La identificación de un biomarcador específico de daño hepático y pulmonar precoz, fácil de obtener y medir, permitiría identificar precozmente a los individuos susceptibles de desarrollar enfermedad hepática y/o pulmonar y actuar para prevenir su desarrollo o progresión. Además podrían servir como marcadores de respuesta al tratamiento. Los microRNAs cumplen todas estas características, con lo que podrían ser excelentes biomarcadores.

3.2. Hipótesis

En este trabajo planteamos la hipótesis de que la firma genética de los miRNAs circulantes en los pacientes con DAAT es distinta a la de los individuos control, y -a su vez- los pacientes con DAAT que desarrollan patología, poseen otra firma distinta a los pacientes deficitarios sanos. Ésta última se formaría antes de que la enfermedad se expresara clínicamente y podría ser de gran utilidad pronóstica. Además, el análisis bioinformático de las funciones permintirá proponer nuevas estrategias terapéuticas.

3.3. Objetivos

El **objetivo principal** del estudio es hallar una firma genética de los microRNAs plasmáticos que permita diferenciar el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con DAAT.

El **objetivo secundario** es relacionar esta firma genética con su función celular mediante análisis bioinformático y proponer así, nuevas estrategias terapéuticas.

4. Material y métodos

4.1. Pacientes

4.1.1. Demografía de los sujetos de estudio

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio 35 de la UCIM-FIHCUV-INCLIVA. Es un estudio observacional de casos-controles que proporciona información sobre los microRNAs circulantes en el DAAT descriptivo y exploratorio.

En el estudio se incluyeron pacientes con DAAT, pediátricos y adultos, con los fenotipos MS, MZ, SZ y ZZ que no habían desarrollado patología (ni pulmonar, ni hepática), pacientes con DAAT y enfermedad (tanto enfisema como hepatopatía) y sujetos control (MM). Las muestras de los sujetos del estudio se obtuvieron en la Unidad de Neumología infantil del Hospital Clínico Universitario de Valencia y en los Servicios de Neumología del Complejo Universitario de Vigo y del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. En cada uno de los hospitales el proyecto fue aprobado por el CEIC (Anexo 1). Y cada uno de los sujetos incluidos expresaron su acuerdo en la participación en el mismo mediante la firma del consentimiento informado (Anexo 2).

Criterios de inclusión: i) pacientes diagnosticados de DAAT, de acuerdo con las recomendaciones de la ATS/ERS; ii) individuos control sin antecedentes o hallazgos clínicos que sugirieran enfermedad pulmonar o hepática.

Criterios de exclusión: pacientes afectados de i) Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) no relacionada con el DAAT, ii) enfermedad hepática no relacionada

con el DAAT, iii) disfunción cardíaca, iv) infección activa, v) enfermedades autoinmunes; vi) trastornos neurológicos; vii) trastornos psiquiátricos; viii) cáncer.

4.1.2. Cálculo del tamaño muestral

El tamaño muestral para un nivel de confianza del 95%, con un error alfa de 0,05 y un error beta de 0,20, se ha estimado en 20 pacientes, basándonos en los estudios de prevalencia de la enfermedad en la población española. El cálculo de la población de estudio se ha realizado con el software Ene 2.0 (GlaxoSmithKline)

4.1.3. Anamnesis y evaluación general

Toda la información de los sujetos de estudio se introdujo en una hoja de recogida de datos (Anexo3 y 3b), donde se registraron los siguientes parámetros: fecha de nacimiento, edad en el momento de la entrevista (años), edad de comienzo de la clínica (años), sexo, peso, talla, índice de masa corporal, y antecedentes de enfermedades respiratorias o infecciosas.

La situación clínico-patológica de los pacientes incluidos en el estudio se valoró a través de la determinación de:

Antropometría: Las mediciones antropométricas se realizaron utilizando técnicas estándar. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como la relación de peso (Kg)/altura (m^2)

Determinación de la función pulmonar: Se realizó mediante espirometría. Se determinaron, el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1), la capacidad

vital forzada (FVC), la relación FEV1/FVC. Los valores de normalidad de la función pulmonar se han definido como: FEV1 y FVC \geq 80% del valor teórico, FEV1/FVC $>$ 80% del valor teórico.

Determinación de la función hepática: Incluyen la determinación de las enzimas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST), alanín aminotransferasa (ALT) y gamma glutamil-transferasa (GGT), que se realizaron por los procedimientos rutinarios del laboratorio de análisis clínicos de los hospitales de procedencia. Se han tomado como valores de referencia para cada enzima: AST 1-37 U/L; ALT 1-41 U/L y GGT 1-55 U/L.

Concentración sérica de la AAT. La determinación de la concentración plasmática de AAT se realizó mediante nefelometría por cada uno de los hospitales de procedencia. El intervalo de referencia de normalidad ha sido de 90 a 200 mg/dl. Los fenotipos AAT se determinaron mediante isoelectroenfoque.

4.1.4. Recogida de plasma y aislamiento de los miRNAs plasmáticos

De cada paciente se recogió una muestra de sangre venosa (8 ml) en un tubo BD Vacutainer CPT con EDTA como anticoagulante (REF: 367863). La separación del plasma se realizó en un Tubo BD Vacutainer CPT con gel separador, anticoagulante y Ficoll (REF: 362761), mediante centrifugación a 2500 x g durante 30 minutos. El plasma obtenido se alicuotó en criotubos y guardó a -80°C hasta su procesamiento.

El aislamiento de los miRNAs se efectuó a partir de plasma, utilizando el *kit* mirVana PARÍS (REF: AM1560, Life Technologies) y recopilando el RNA total circulante siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Primero se lisó el plasma con una solución de lisis desnaturalizante, que estabiliza el RNA e inactiva las RNAsas. El lisado se extrajo con ácido-fenol: cloroformo que elimina la mayoría de otros componentes celulares, incluyendo la mayor parte del DNA, dejando una muestra de RNA semipura. Adicionalmente, ésto se purificó sobre un filtro de fibra de vidrio para obtener el RNA total, incluyendo las especies de RNA muy pequeñas. El filtro de fibra de vidrio utiliza soluciones formuladas específicamente para la retención de los miRNA y para evitar la pérdida de los RNAs pequeños. Para ello, se añadió etanol a las muestras y se pasó a través del filtro de fibra de vidrio que inmoviliza el RNA. A continuación, el filtro se lavó varias veces y, finalmente, el RNA se eluyó en una solución de baja fuerza iónica (Fig. 20)

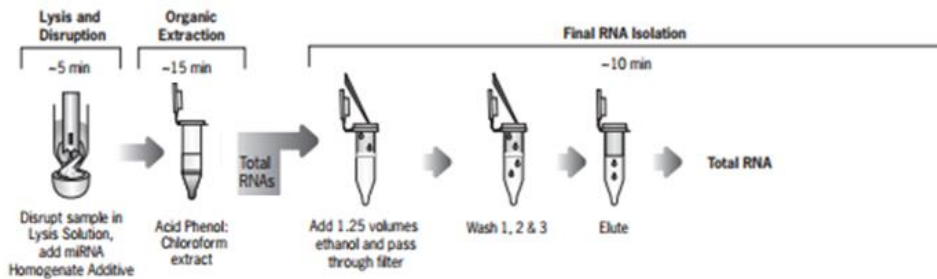


Figura 20. Protocolo de extracción del RNA, modificado del protocolo de miRvana (216).

Para la validación de los microRNAs con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos se volvió a aislar el RNA de las muestras plasmáticas con la adición del miRNA exógeno cel-miR-54-3p, utilizado para la normalización de la expresión génica.

4.2. Determinación del perfil de expresión de los miRNA plasmáticos

4.2.1. Preparación del microarray

Un *microarray* o *array* es un formato basado en la fijación de sondas, en nuestro caso miRNAs, sobre un sustrato sólido y expuestos a las moléculas diana. El nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*) y la molécula diana (*target*), se indica mediante fluorescencia y se mide mediante un análisis de imagen que indica el nivel de expresión de cada una de las moléculas diana de la muestra. Es decir, de cada una de las muestras (*microarray*) se obtienen los niveles de expresión (fluorescencia) de muchas sondas (miRNAs) (217).

Para la determinación del perfil de expresión de los miRNAs plasmáticos se utilizó GeneChip miRNA 3.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.) con 3.391 sondas diferentes entre pre-miRNAs y miRNAs maduros. Los experimentos de *microarrays* se ejecutaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el servicio de análisis multigénico (Affymetrix) de la UCIM-FIHCUV-INCLIVA. De cada muestra se marcaron 130 ng de ARN total, utilizando para ello el FlashTag Biotina HSR RNA Labeling Kit (Genisphere). La reacción de marcaje se hibridó en a 48 °C, durante 18 horas. Los *arrays* se tiñeron utilizando la Fluidics Station 450, y fueron posteriormente escaneados con el escáner GeneChip 7G 3000 (Affymetrix).

4.2.2. Análisis bioinformático de los resultados de los microarrays

El flujo de trabajo llevado a cabo al realizar un análisis masivo de datos se muestra en la figura 21.



Figura 21. Flujo de trabajo a seguir para el análisis bioinformático de los *arrays*.

4.2.2.1. Pre-procesado

La información que se obtiene de cada uno de los *arrays* es la intensidad de cada una de las sondas que componen el *array*. Tanto las diferentes condiciones experimentales, como el fondo en las hibridaciones o las diferentes intensidades entre los *arrays*, afectan las lecturas. Para solucionar estos problemas, eliminar el ruido de fondo y poner, tanto las distintas zonas como los distintos *microarrays*, a la misma escala y punto cero, se realiza la normalización (Fig. 22). Existen múltiples métodos de normalización; en nuestro caso, se utilizó el método *Robust Multiarray Average* (RMA) (218) donde la intensidad de la señal se estandariza mediante el

algoritmo de normalización cuantil (219), con el *software* *Expresion Console* (Affymetrix). Tras conseguir la normalización de los datos, se realizó un análisis exploratorio de los mismos mediante un *clustering* no supervisado y gráficos *Principal Component Analysis* (PCA), con el *software* R. El objetivo de los análisis exploratorios era valorar el comportamiento de los datos del estudio y así utilizar el modelo matemático más apropiado a ellos para la expresión diferencial.

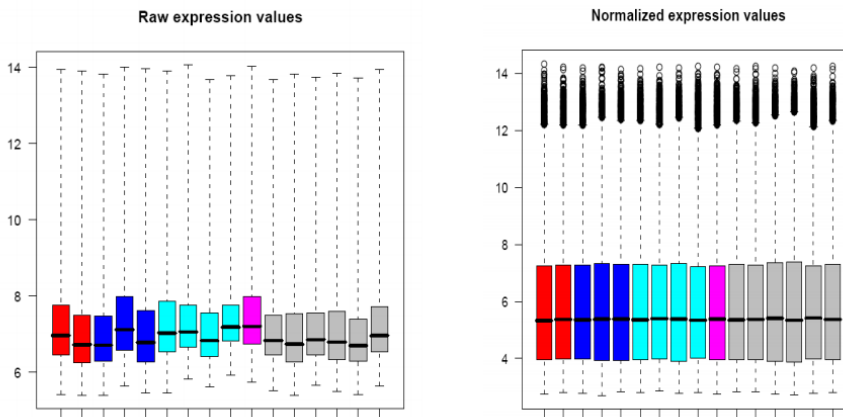


Figura 22. Diferencias de fluorescencia por la normalización del *array*. A la izquierda, un diagrama de cajas de las fluorescencias de los *arrays* sin normalizar; a la derecha los mismos *arrays* normalizados.

4.2.2.2. Expresión diferencial

La expresión diferencial de los microRNAs se efectuó usando el test estadístico de la *t* limma (220).

Las técnicas de análisis de los *microarrays* estándar realizan un test para comparar cada una de las sondas (en nuestro caso miRNA). Por tanto, para cada miRNA se obtiene un *p* valor "bruto"; es decir, este examen no tiene en cuenta que la comparación global está compuesta por cientos o miles de tests, por lo que es

necesario corregir estos p valores con el fin de minimizar la cantidad de falsos positivos. Existen múltiples algoritmos para ajustar el p valor; en este caso se utilizó el de Benjamini y Hochberg (221).

El análisis de expresión diferencial se puede abordar con diferentes modelos matemáticos, en los que se pueden incluir diferentes covariables. El análisis se planteó por grupos de riesgo: control (MM), bajo (MS y SS), intermedio (MZ y SZ) y alto riesgo (ZZ). El siguiente paso fue realizar el mismo análisis agrupándolos según el fenotipo y dividiendo el grupo intermedio en MZ y SZ. Por último, se llevaron a cabo dos análisis más agrupando los pacientes en función de que hubieran desarrollado, o no, enfermedad pulmonar o hepática y comparándolos con el resto de los sujetos del estudio. Todos estos análisis se realizaron usando, o no, la edad como covariable, tanto de forma continua (la edad numérica) o de forma categórica (niño o adulto). Del mismo modo se aplicaron a dos grupos diferentes, los sujetos pediátricos por una parte y los adultos por otra, como muestra el esquema de la figura 23.

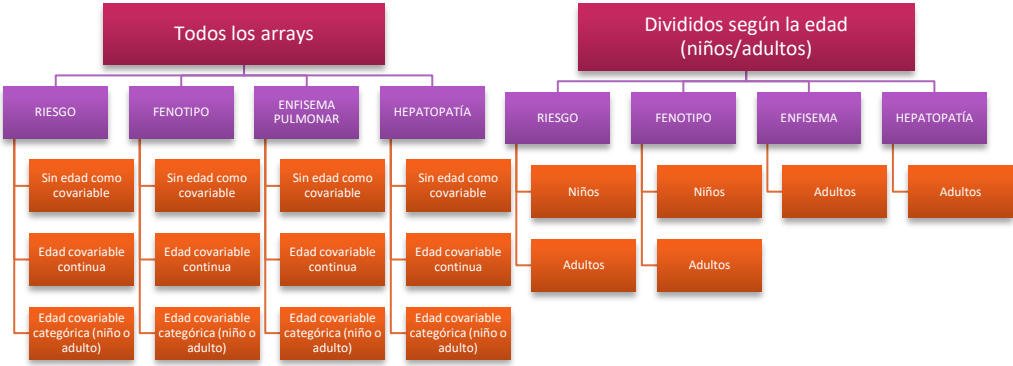


Figura 23. Esquema de los diferentes análisis de expresión diferencial.

Tras efectuar estos análisis, se vió que las diferencias existentes entre los grupos eran demasiado sutiles y que, teniendo 3.391 sondas diferentes, al ajustar los p valores no se percibían las diferencias. Se decidió entonces, filtrar las sondas para quedarnos sólo con aquellos análisis capaces de mostrar los cambios más importantes entre los sujetos del estudio. Para ello se utilizó el coeficiente de variación, que hace referencia a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable, y que -en nuestro caso- sería cada uno de los microRNAs. Con estos filtrados se decidieron 4 escenarios en cada análisis previo (sin filtrar, 3.391 microRNAs; filtrando en el percentil 50, P50, 1.695 microRNAs; filtrando en el percentil 75, P75, 846 microRNAs; y filtrando en el percentil 95, P95, 170 microRNAs) (Fig. 24)

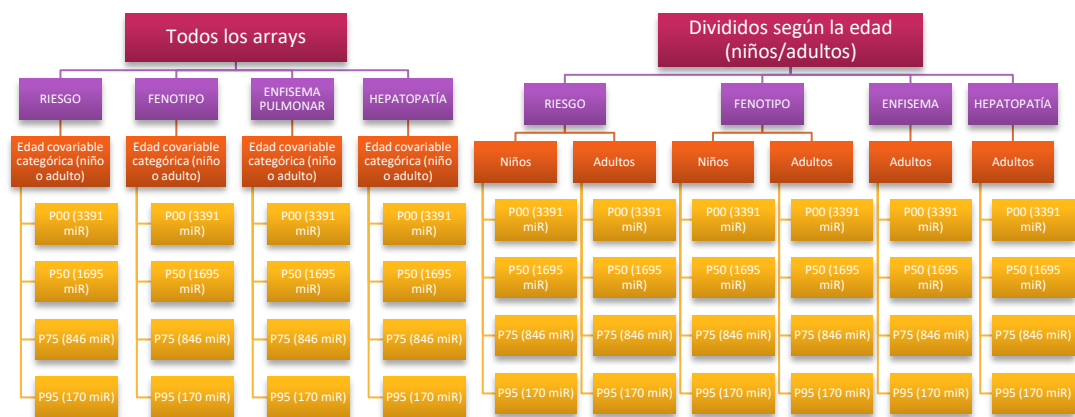


Figura 24. Esquema de los diferentes análisis de expresión diferencial con los filtrados.

Todos y cada uno de los distintos análisis realizados son matemáticamente igual de válidos, por lo que se pueden utilizar como análisis exploratorio de los datos. El objetivo final de todos ellos es “conocer” los datos para poder elegir uno o varios modelos de donde extraer los microRNAs para su posterior validación mediante RT-qPCR.

4.2.2.3. **Enriquecimiento funcional**

Por último, se llevaron a cabo unos análisis de enriquecimiento funcional, con el fin de obtener información sobre las funciones diferencialmente representadas en los diferentes grupos del estudio. Del listado obtenido con los microRNAs diferencialmente expresados se pasa a una lista con los genes diferencialmente expresados y a la función de estos grupos de genes (Fig. 25).

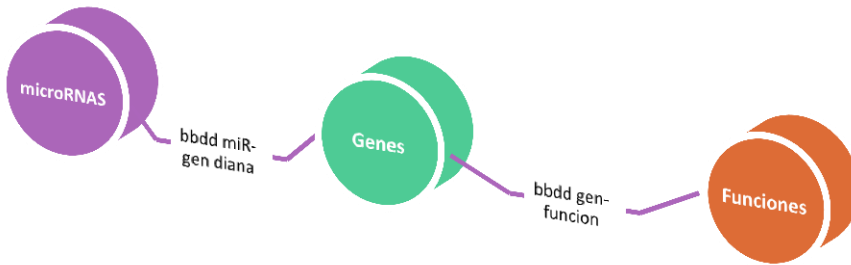


Figura 25. Esquema explicativo de cómo pasar de los miRNA a la funciones que inhiben.

Los análisis funcionales también se abordaron desde dos enfoques distintos: análisis del conjunto de genes (222-224) realizado con los resultados obtenidos de los *microarrays* y análisis de la sobrerepresentación (225), efectuado con los microRNAs validados mediante PCR.

El **análisis del conjunto de genes** busca localizar los bloques funcionales reprimidos en alguna de las condiciones, utilizando el modelo de regresión logístico descrito por Montaner y Dopazo (224) y por García-García *et al.* (223). En este análisis se utilizan todos los datos obtenidos en el *array*. Los microRNAs se ordenan según su nivel de expresión. Después, se pasa de la expresión de estos microRNAs al RNAm que inhiben; el problema es que cada microRNA no inhibe únicamente a un RNAm, y cada RNAm está potencialmente inhibido por diferentes microRNAs (Fig. 17). Para solucionar este problema se creó un estadístico para cada microRNA que tiene en cuenta tanto el p valor como el estadístico (la dirección de la expresión diferencial, es decir, si el microRNA está aumentado o disminuido). Cuando un mismo RNAm está regulado por más de un miRNA se suman los estadísticos. Así, al final se obtiene información de la expresión de los genes, teniendo en cuenta todos los microRNAs que -hasta el momento- se sabe que influyen en su regulación.

Para la obtención de los genes diana de los miRNAs se pueden utilizar diferentes bases de datos. En nuestro caso, primero se utilizaron bases de datos microRNA-gen diana con la información obtenida experimentalmente. Estas bases de datos proporcionaban poca cobertura, por lo que se recurrió a otras que predicen el RNAm diana mediante modelos matemáticos. Esta información se muestra en la tabla VII. Para la obtención de los resultados se decidió usar la base de datos experimental BioMart, que es la que proporcionaba mayor información de los microRNAs incluidos en el estudio, y con la base de datos de predicción informática miRwalk 2.0 (226, 227).

Tabla VII. Cobertura de microRNAs utilizada con cada una de las bases de datos.

| Experimental | | |
|--|------------------------|-----------------------------------|
| bbdd | microRNAs en bd | microRNAs bd y experimento |
| Target. Gene | 547 | 205 |
| BioMart | 1081 | 468 |
| Experimental + predicción informática | | |
| miRwalk | 2649 | 1155 |

Por otra parte, se realizó un segundo análisis funcional utilizando los miRNAs estadísticamente significativos obtenidos en la validación mediante qPCR que se explica más adelante. Para ello, se efectuó un **análisis de sobrerrepresentación**. Para la obtención de los RNAm *targets* de estos microRNAs, se empleó la herramienta *web* mirWalk 2.0 (226, 227). Con el fin de lograr unos resultados funcionales más fiables, se utilizó una de las bases de datos de interacción miRNA-gen diana, validados experimentalmente en vez de las predicciones bioinformáticas, y de las bases de datos disponibles se escogió la miRbase (228, 229). En este punto, se pasa de tener una lista de microRNAs diferencialmente

expresados, a una lista de genes diferencialmente reprimidos. Este listado de genes se compara después con todo el genoma para ver qué funciones están más o menos representadas, y para ello se usó FatiGO (230), herramienta implementada en babelomics (225, 231). La figura 26 muestra la representación gráfica de cómo se ha pasado de la expresión de los microRNAs a la inhibición de las funciones por estos microRNAs.

Un sólo microRNA tiene la capacidad de modificar la expresión de muchos genes e inhibir múltiples funciones, pero esto no ocurre así en todos los tipos celulares, ya que cada uno expresa una porción distinta del genoma que va cambiando con el tiempo. Por ello, en éste análisis funcional aparecen funciones que no están relacionadas con el proceso patológico y, en cada uno de los análisis, se revisaron todas ellas, mostrando -solamente- las que podrían estar ligadas con el déficit, sobre todo las pulmonares y hepáticas, ya que nuestra hipótesis plantea que el desequilibrio de los microRNAs procede de estos órganos, que son los implicados en la enfermedad.

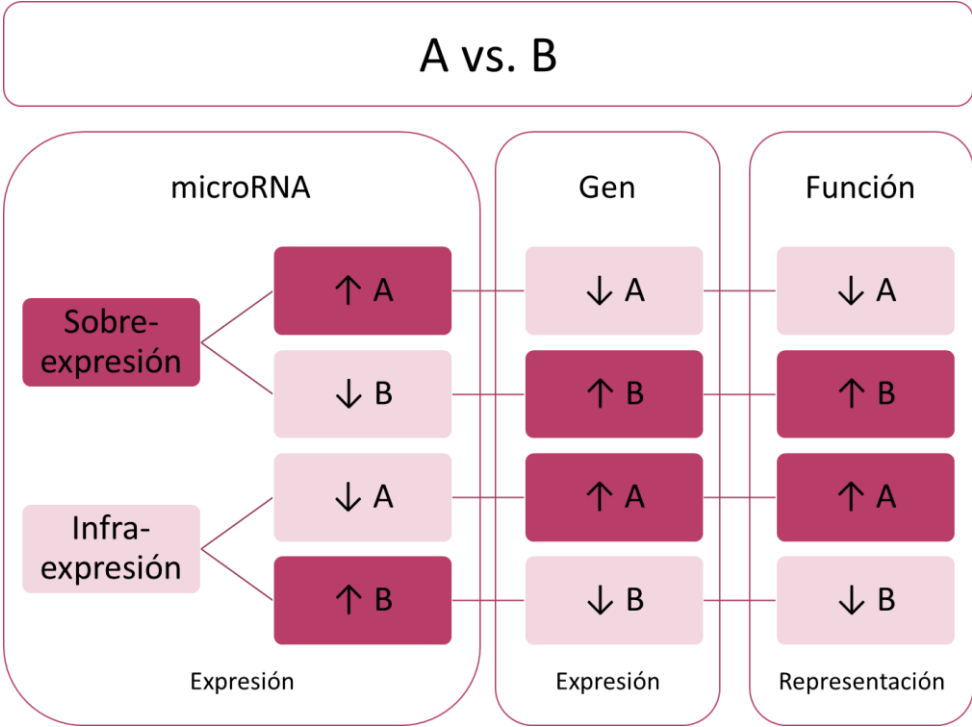


Figura 26. Esquema de la extrapolación de la expresión de los microRNAs a la representación de las funciones.

4.2.3. Validación mediante qRT-PCR a tiempo real

Para la validación de los miRNAs se volvió a aislar el RNA total. Con el fin de lograr una normalización más estable, se añadió un microRNA sintético (cel-miR-54-3p), 20 fentomoles en 200µL de plasma (232) antes de la extracción del RNA con el *kit* miRVANA parís (Ambion). Los microRNAs con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos fueron seleccionados y se validaron mediante RT-

qPCR. La transcripción reversa de los miRNAs expresados diferencialmente, se realizó usando *TaqMan Advance miRNA cDNA synthesis kit* (Applied biosystem). Este nuevo *kit* permite realizar una única retrotranscripción para todo el conjunto de microRNAs, y ésto es posible gracias a la adición de una cola poli-A en el extremo 3' y un adaptador en el extremo 5' que extiende por cada extremo los miRNA maduros presentes en la muestra antes de la transcripción reversa. Los *primers* universales de RT (transcripción reversa) reconocen las secuencias universales presentes en los extremos ampliados 5' y 3' de los miRNAs maduros. Así, todos los miRNAs maduros de la muestra se transcriben en cDNA. (Fig. 27).

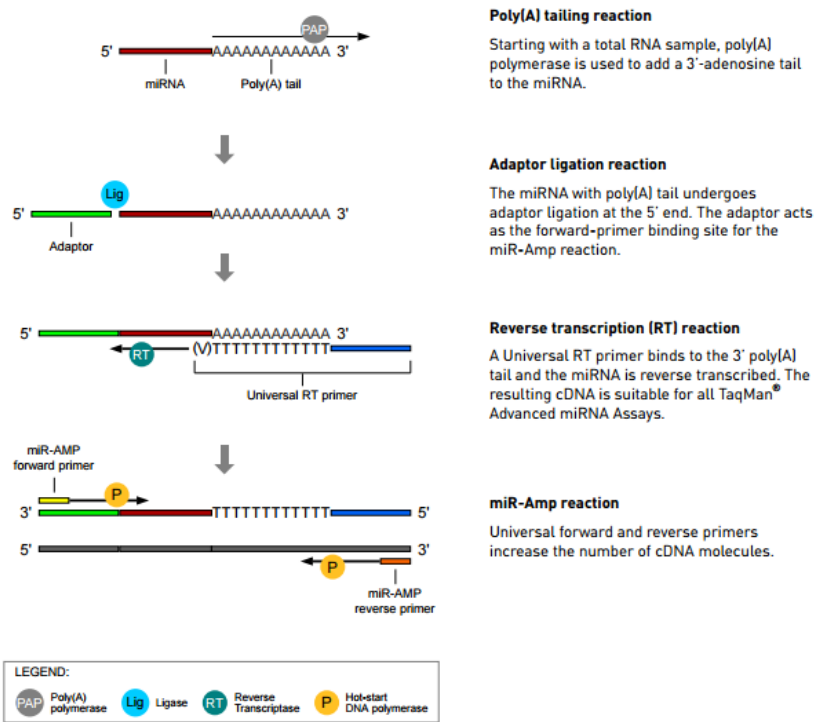


Figura 27. Esquema explicativo de la RT universal (233).

Los niveles específicos de los diferentes miRNAs se determinaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando *primers* y sondas TaqMan específicos para cada miRNA. Cada muestra se analizó por duplicado, y la expresión de cada miRNA se determinó por el método $2^{-\Delta Ct}$ (234).

4.2.4. Análisis estadístico

Todos los datos están expresados como media \pm desviación estándar. Se consideran resultados estadísticamente significativos cuando el p valor es menor a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron con los *software* Graph Pad Prism 6.0, SPSS versión 22 y R versión 3.3.0.

4.2.4.1. Datos demográficos de los pacientes

Para cada una de las variables se comprobó si para cada uno de los grupos los datos seguían la distribución normal, mediante el test de Shapiro Wilk. Si era así se utilizaba el test paramétrico ANOVA; en cambio si en alguno de los grupos los datos no seguía la distribución normal se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Para calcular las diferencias entre dos variables categóricas (presencia de enfermedad pulmonar y hepática frente al fenotipo) se ha utilizado el test chi cuadrado.

4.2.4.2. microRNA validados mediantr RT-qPCR

Para cada uno de los microRNAs, primero se realizaron test multivariantes usando como covariable la edad (en continua y categórica, al igual que en los *arrays*) y el sexo. En el caso de que las co-variables no alcanzaran significación estadística, se procedía al análisis univariante de los datos con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, debido a la diferencia de muestra entre los grupos. Para los test *post hoc* se utilizó el test de Dunn. Para comprobar la fiabilidad de los microRNAs como posibles marcadores, se usaron las curvas ROC, admitiéndose como buen biomarcador un AUC (área bajo la curva), mayor de 0,8.

5. Resultados: microarray

5.1. Pacientes

La población de estudio se componía de 56 individuos con una edad media de 19,54 años, 44,64% de adultos, 89,29% de sanos, 4 enfermos pulmonares, 2 pacientes con hepatopatía. La información clínica y demográfica de los pacientes que se incluyen en el análisis de los *arrays* se especifica en las tablas VIII, IX y X.

En la tabla VIII se muestra la información clínica y demográfica de todos los sujetos de estudio. La enfermedad se produce por un déficit de la AAT cuya concentración sérica presenta diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes fenotipos. En cuanto a las características demográficas, la edad y el IMC no varían entre los diferentes grupos. Con respecto a las características clínicas, existe mayor probabilidad de desarrollar enfisema en el grupo ZZ, aunque los parámetros espirométricos no son estadísticamente significativos ya que, aunque sus valores están disminuidos, al comparar la media con el resto de pacientes ZZ, esta disminución no se aprecia en la tabla. No existen diferencias estadísticamente significativas en las transaminasas, ni en el porcentaje de casos con enfermedad hepática en función del fenotipo.

Tabla VIII: Características clínicas y demográficas de todos los sujetos de estudio. Los valores se expresan mediante media \pm desviación estándar.

| MUESTRA TOTAL (n=56) | | | | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| fenotipo (n) | MM (19) | MS (6) | MZ (14) | SZ (7) | ZZ (10) | p valor |
| riesgo | Controles | Bajo | Intermedio | Intermedio | Alto | |
| AAT | 141,63 \pm 24,73 | 120,75 \pm 14,42 | 88,67 \pm 16,86 | 56,86 \pm 26,70 | 27,08 \pm 16,41 | < 0,0001 |

| | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| mg/dL | | | | | | |
| Edad años | 25,58 ± 9,35 | 30,85 ± 17,72 | 21,67 ± 17,54 | 34,14 ± 26,76 | 25,10 ± 16,84 | 0,6323 |
| IMC Kg/m ² | 20,49 ± 3,37 | 20,51 ± 4,10 | 23,55 ± 7,78 | 22,95 ± 3,02 | 22,34 ± 3,66 | 0,3796 |
| FEV₁ % | - | 102,17 ± 14,73 | 103,957 ± 8,63 | 101,61 ± 24,22 | 97,36 ± 17,14 | 0,7955 |
| FVC % | - | 96,38 ± 9,08 | 98,30 ± 9,65 | 103,39 ± 17,61 | 98,52 ± 11,50 | 0,7351 |
| FEV1/FVC % | - | 97,75 ± 11,31 | 88,47 ± 38,38 | 82,15 ± 15,61 | 94,77 ± 12,18 | 0,5432 |
| enfisema | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0,0178 |
| AST U/L | 26,67 ± 7,50 | 24,17 ± 2,71 | 26,50 ± 7,67 | 25,20 ± 2,39 | 32,00 ± 17,97 | 0,7603 |
| ALT U/L | 22,44 ± 8,14 | 18,67 ± 4,19 | 25,93 ± 13,93 | 24,60 ± 4,16 | 35,00 ± 22,85 | 0,2318 |
| GGT U/L | 22,67 ± 10,52 | 19,33 ± 8,33 | 18,60 ± 5,49 | 21,20 ± 6,53 | 19,14 ± 2,54 | 0,8279 |
| hepatopatía | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,2652 |

En la tabla IX se muestra la información clínica y demográfica de todos los sujetos pediátricos. Los valores de AAT presentan diferencias estadísticamente significativas que se relacionan con el fenotipo. La edad y el IMC no varían entre los diferentes grupos. En cuanto a las características clínicas, observamos que un individuo SZ padecía enfisema, pero este hecho no es estadísticamente significativo; del mismo modo, los parámetros espirométricos no presentan diferencias estadísticamente significativas. En nuestra población de estudio

ninguno de los sujetos padece enfermedad hepática; aún así, dos de las tres enzimas que miden la “salud” del hígado muestran un incremento estadísticamente significativo, aunque ninguno de ellos supere los límites establecidos.

Tabla IX: Características clínicas y demográficas de los sujetos pediátricos incluidos en el estudio. Los valores se expresan mediante media \pm desviación estándar.

| NIÑOS (n=31) | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| fenotipo (n) | MM (10) | MS (4) | MZ (8) | SZ (4) | ZZ (5) | P valor |
| riesgo | Controles | Bajo | Intermedio | Intermedio | Alto | |
| AAT mg/dL | 144,81 \pm 26,31 | 121,83 \pm 19,98 | 88,00 \pm 20,46 | 57,50 \pm 4,04 | 24,16 \pm 3,82 | < 0,0001 |
| Edad años | 11,54 \pm 3,50 | 13,33 \pm 1,15 | 9,11 \pm 5,04 | 13,00 \pm 2,94 | 13,40 \pm 4,67 | 0,2761 |
| IMC Kg/m ² | 19,97 \pm 2,44 | 18,43 \pm 2,79 | 19,29 \pm 2,08 | 22,08 \pm 1,90 | 20,70 \pm 2,92 | 0,2249 |
| FEV₁ % | - | 102,17 \pm 14,73 | 106,02 \pm 9,39 | 102,33 \pm 34,02 | 100,08 \pm 8,78 | 0,9125 |
| FVC % | - | 96,38 \pm 9,08 | 98,04 \pm 11,53 | 106,75 \pm 23,66 | 100,86 \pm 13,42 | 0,7507 |
| FEV1/FVC % | - | 97,75 \pm 11,31 | 88,46 \pm 42,91 | 78,24 \pm 15,44 | 95,13 \pm 13,63 | 0,6549 |
| enfisema | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0,1244 |
| AST | 34,67 \pm 7,64 | 25,25 \pm 2,63 | 30,71 \pm 7,14 | 20,50 \pm 2,08 | 31,40 \pm | 0,1937 |

| | | | | | | |
|--------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| U/L | | | | | 11,52 | |
| ALT U/L | 21,33 ± 3,51 | 16,75 ± 0,96 | 27,88 ± 17,00 | 24,33 ± 5,86 | 38,40 ± 14,17 | 0,0149 |
| GGT U/L | 15,84 ± 2,13 | 16,50 ± 1,73 | 15,75 ± 2,49 | 16,67 ± 2,08 | 19,40 ± 2,51 | 0,0660 |
| hepatopatía | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,0000 |

En la tabla X se muestra la información clínica y demográfica de todos los sujetos adultos incluidos en el estudio. A medida que la AAT va disminuyendo se incrementa, de forma significativa, el riesgo de padecer enfermedad. En cuanto al IMC no se encuentra variación entre los diferentes grupos, lo que sí sucede con la edad. Por lo que respecta a las características clínicas, existe una mayor probabilidad de desarrollar enfisema en el grupo ZZ, aunque tampoco los parámetros espirométricos muestran significación estadística y, el desarrollo de enfermedad hepática ni las cifras de transaminasas son significativos .

Tabla X: Características clínicas y demográficas de los adultos incluidos en el estudio

| ADULTOS (n=25) | | | | | | |
|-----------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| fenotipo (n) | MM (8) | MS (2) | MZ (7) | SZ (3) | ZZ (5) | P valor |
| riesgo | Control | Bajo | Intermedio | Intermedio | Alto | |
| AAT mg/dL | 137,25 ± 23,34 | 115,25 ± 16,37 | 89,66 ± 10,54 | 62,50 ± 13,52 | 36,80 ± 16,54 | < 0,0001 |
| Edad | 49,00 ± | 44,75 ± | 40,50 ± 10,54 | 58,75 ± 9,17 | 30,00 ± | 0,0034 |

| | | | | | | |
|---------------------------------|------------------|------------------|---------------|------------------|------------------|---------------|
| años | 5,23 | 5,18 | | | 14,30 | |
| IMC Kg/m ² | 24,78 ± 4,68 | 24,65 ± 3,04 | 26,48 ± 8,30 | 26,75 ± 1,74 | 25,07 ± 3,45 | 0,9644 |
| FEV₁ % | - | 99,56 ± 1,42 | 98,80 ± 4,63 | 100,67 ± 4,74 | 94,64 ± 14,37 | 0,7713 |
| FVC % | - | 99,86 ± 1,23 | 98,70 ± 5,09 | 98,90 ± 6,16 | 96,18 ± 10,19 | 0,8985 |
| FEV₁/FVC % | - | 99,38 ± 1,68 | 95,89 ± 4,39 | 87,37 ± 17,38 | 94,42 ± 17,17 | 0,6977 |
| enfisema | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0,0201 |
| AST U/L | 22,67 ± 3,01 | 22,00 ± 1,41 | 22,83 ± 6,31 | 24,50 ± 3,54 | 23,50 ± 7,78 | 0,9598 |
| ALT U/L | 23,00 ± 10,00 | 22,50 ± 6,36 | 24,83 ± 10,76 | 23,67 ± 9,52 | 16,50 ± 10,61 | 0,6788 |
| GGT U/L | 28,00 ± 8,65 | 25,00 ± 15,56 | 14,54 ± 5,68 | 28,00 ± 2,83 | 18,50 ± 3,54 | 0,4829 |
| hepatopatía | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,2537 |

5.2. Análisis bioinformático

Los resultados del análisis bioinformático de los *arrays* se encuentran en la página web http://bioinfo.cipf.es/consulting2010/francisco_dasi/start a la que se puede acceder con el usuario: mirna y contraseña: mirna (235).

5.2.1. Preprocesamiento de los datos

Para poder analizar los datos, primero se procedió a normalizar los resultados obtenidos en los diferentes *arrays* mediante el método RMA. Tras ello, se pasó al análisis exploratorio de los datos mediante el análisis no supervisado mostrado aquí en una serie de gráficas, coloreando los pacientes según las diferentes características clínicas de interés (Fig. 28-31).

La figura 28 muestra que el efecto *batch* (tanda) no es muy fuerte, ya que en el árbol obtenido, los pacientes de cada una de las tandas no están agrupados; sin embargo, en nuestro modelo matemático para la expresión diferencial se ha tenido en cuenta, ya que en él, sí que se aprecian agrupaciones de los pacientes de las diferentes tandas.

La figura 29 muestra un análisis no supervisado mediante un *PCA plot* en el que vemos que no existen grandes diferencias entre todos los microRNAs que permitan separar entre sí los diferentes fenotipos. Mientras que en la figura 30 se aprecia que con un análisis no supervisado tampoco existen grandes diferencias entre todos los microRNAs que separen a los pacientes que han desarrollado enfisema pulmonar.

En la figura 31 se puede apreciar un *clustering* no supervisado coloreado por enfermedad hepática y, al igual que en los gráficos anteriores, no hay agrupación por esta característica clínica

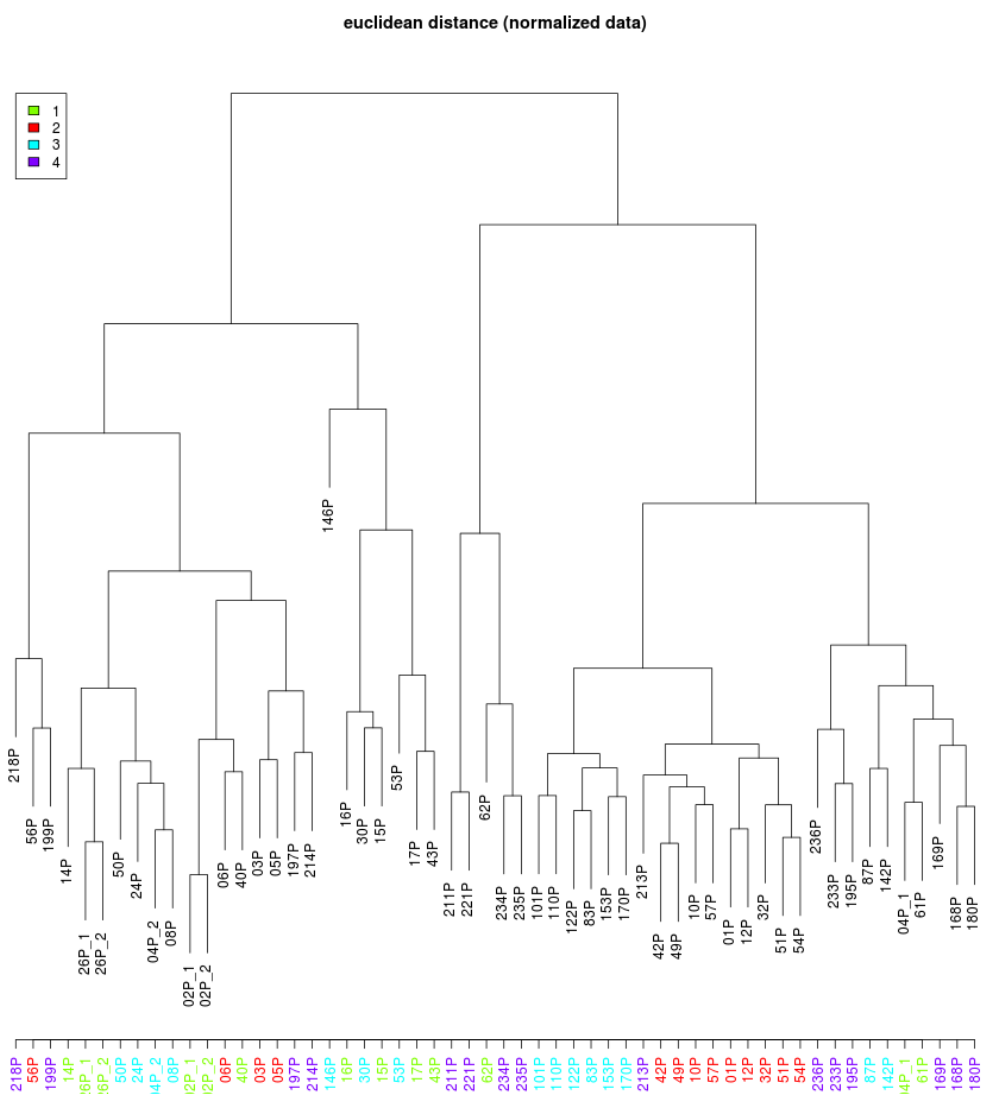


Figura 28. *Clustering no supervisado coloreado por batch (tanda en la que se realizó el array) con todos los sujetos del estudio.*

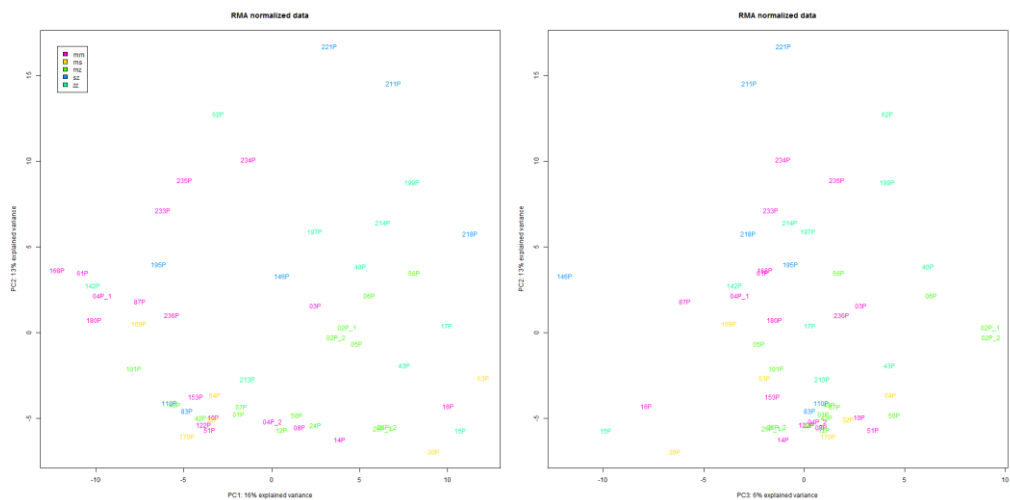


Figura 29. PCA coloreado por fenotipo con todos los sujetos del estudio.

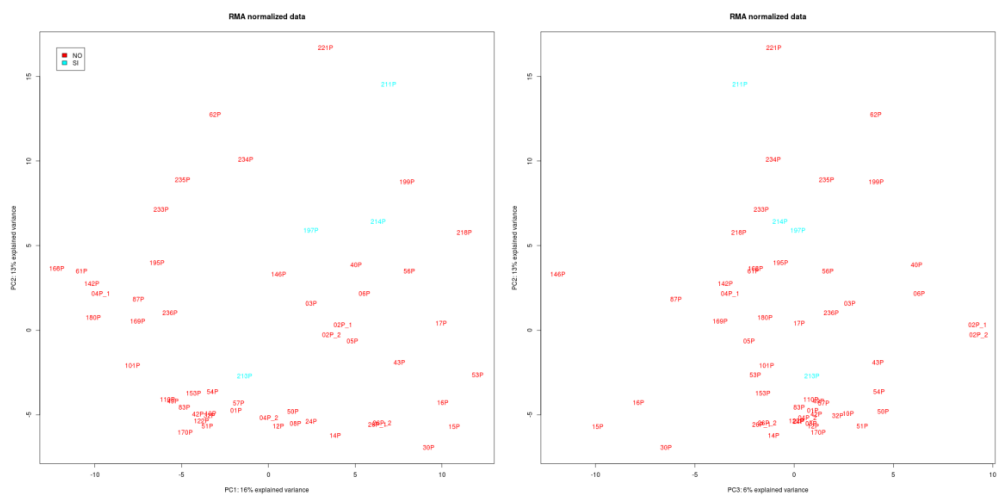


Figura 30. PCA coloreado por enfiema con todos los sujetos del estudio.

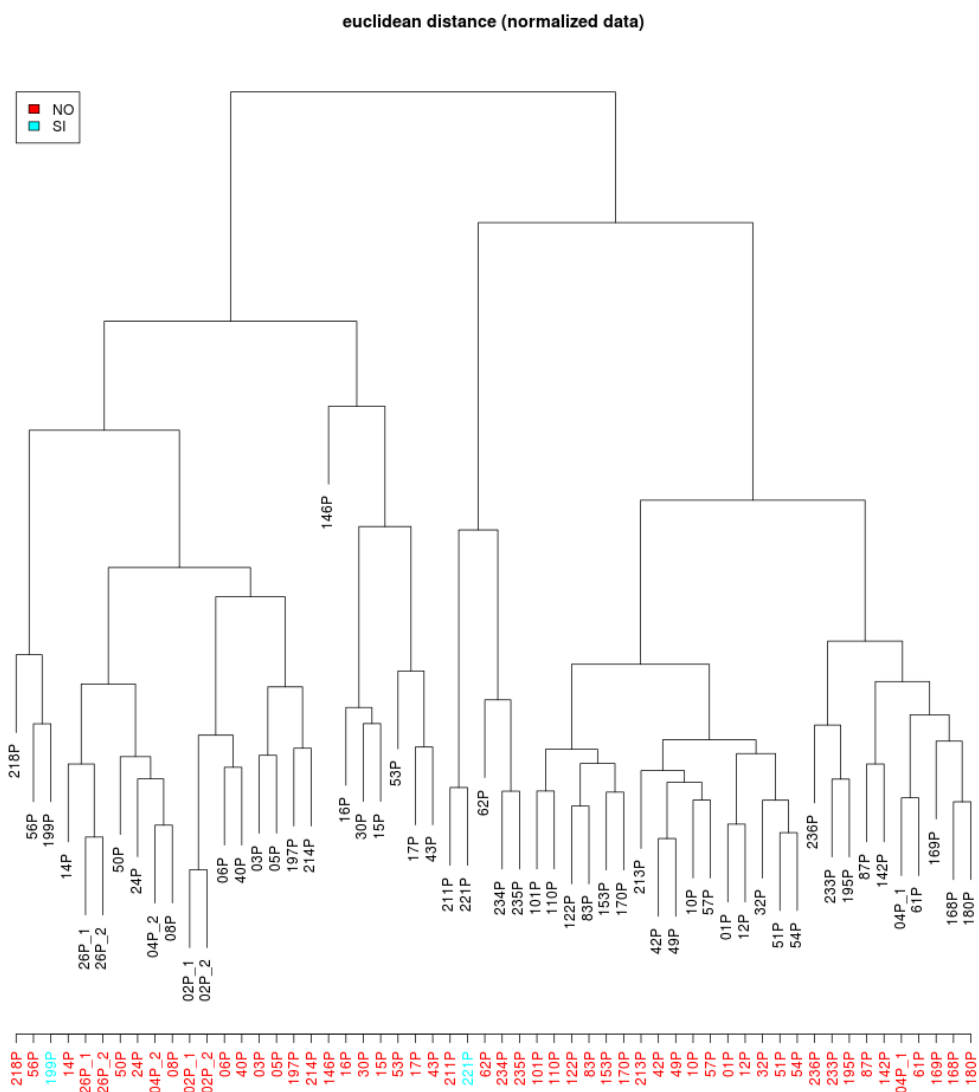


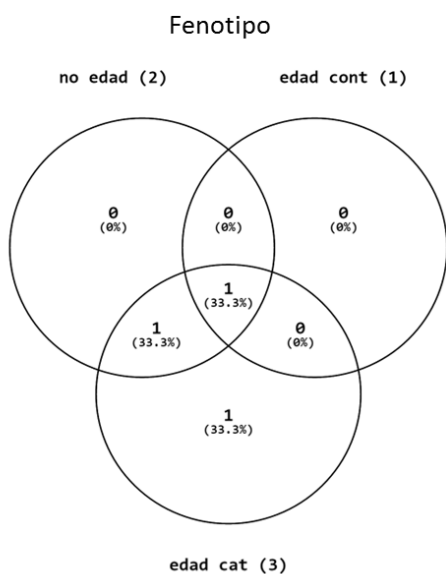
Figura 31. Clustering no supervisado coloreado por enfermedad hepática.

5.2.2. Expresión diferencial

La expresión diferencial entre los diferentes grupos se puede analizar mediante diferentes modelos matemáticos y, como se ha explicado en material y métodos en nuestro caso hemos comprobado los resultados desde diferentes abordajes.

En la página *web* sólo se muestran los análisis de todos los sujetos incluidos en el estudio con el modelo que utiliza la edad como co-variable categórica, es decir, diferenciando a los sujetos pediátricos de los adultos ya que, de este modo, se obtienen más microRNAs con diferencias estadísticamente significativas (Fig. 32).

A)



B)

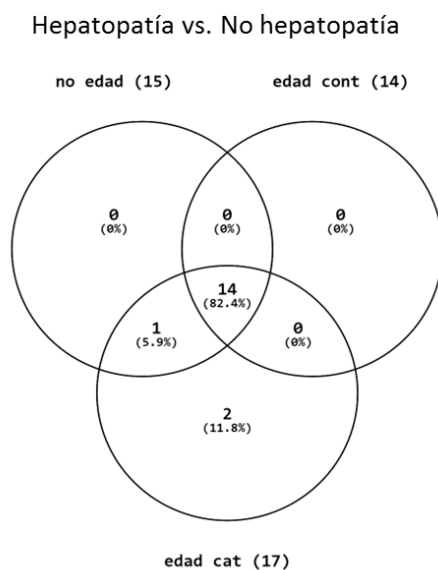


Figura 32. Gráficos de Venny (236) donde se muestran los microRNAs, con diferencias estadísticamente significativas, de los diferentes análisis realizados con todos los sujetos incluidos en el estudio, sin usar la edad como covariable y utilizando la edad como variable continua y variable categórica. A) análisis por fenotipo; B) análisis por hepatopatía.

5.2.2.1. Elección de los microRNAs para validación mediante RT-qPCR

Tras examinar cuidadosamente todos los análisis, se decidió utilizar los que contenían todos los microRNAs, debido a que el filtrado había reducido el número de sondas a analizar sin variar mucho los microRNAs que eran estadísticamente significativos. Además, los filtrados permitieron detectar algún análisis que daba falsos positivos, al encontrar el microRNA en el análisis inicial (sin filtrar) que se perdía al filtrarlo por el coeficiente de variación.

En el grupo de pacientes con hepatopatía, al ser muy pequeño (sólo 2 pacientes) y haber obtenido tantos resultados significativos (datos que se pueden comprobar en la página *web* citada anteriormente), se decidió validar todos los microRNA capaces de diferenciar los ZZ sanos de los que padecen hepatopatía, ya que –clínicamente– sería el biomarcador más importante. De los otros dos análisis (hepatopatía vs no hepatopatía y hepatopatía vs. MM) se decidió validar los que, **además de tener un p valor menor de 0,05, poseía un *fold change* (diferencia de expresión) mayor de dos**. En la tabla XI se muestran los microRNAs elegidos para la validación mediante qPCR y los análisis en los que son estadísticamente significativos con sus p valores “brutos” y ajustados.

Tabla XI: Selección de microRNAs para la validación mediante qPCR y análisis en los que son estadísticamente significativos.

| miRNA | análisis significativo | P valor | P valor ajustado |
|---------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| hsa-let-7a | hepatopatía vs. ZZ sano | 6,67398E-07 | 0,001131573 |
| hsa-let-7c | hepatopatía vs. ZZ sano | 0,00017087 | 0,04828547 |
| hsa-let-7d | hepatopatía vs. ZZ sano | 5,766E-05 | 0,02444063 |
| hsa-miR-103a | hepatopatía vs. MM | 1,8696E-05 | 0,00372935 |

| | | | |
|------------------------|--------------------------------|------------|------------|
| hsa-miR-106a | hepatopatía vs. No hepatopatía | 0,0000695 | 0,0196400 |
| | hepatopatía vs. MM | 3,0686E-06 | 0,00107707 |
| hsa-miR-106b | SZ vs. MM | 1,39E-05 | 0,047283 |
| | hepatopatía vs. ZZ sano | 0,00012263 | 0,03788936 |
| hsa-miR-107 | hepatopatía vs. MM | 9,0679E-07 | 0,00061498 |
| hsa-miR-122 | zz sano vs mm | 0,0000695 | 0,0196400 |
| | enfisema vs. MM | 2,8393E-06 | 0,00962807 |
| hsa-miR-150 | hepatopatía vs. ZZ sano | 0,00012291 | 0,03788936 |
| hsa-miR-151-5p | hepatopatía vs. ZZ sano | 1,2982E-05 | 0,00880467 |
| hsa-miR-17 | MM vs. ZZ | 1,233E-05 | 0,32976 |
| | MM vs. ZZ (P95) | 1,233E-05 | 2,097E-03 |
| | hepatopatía vs. MM | 7,0789E-06 | 0,00184651 |
| hsa-miR-191 | hepatopatía vs. ZZ sano | 2,8548E-05 | 0,0139073 |
| | hepatopatía vs. No hepatopatía | 0,0001115 | 0,0252163 |
| | hepatopatía vs. MM | 1,181E-08 | 2,0024E-05 |
| hsa-miR-23a | hepatopatía vs. ZZ sano | 2,7253E-06 | 0,00308052 |
| | hepatopatía vs. No hepatopatía | 0,0000334 | 0,0113141 |
| | hepatopatía vs. MM | 1,2324E-07 | 0,0001393 |
| hsa-miR-23b | hepatopatía vs. ZZ sano | 0,00010341 | 0,03788936 |
| hsa-miR-24 | zz sano vs. mm | 1,39E-05 | 0,02352582 |
| | hepatopatía vs. ZZ sano | 1,39E-05 | 0,02352582 |
| | hepatopatía vs. No hepatopatía | 0,0000023 | 0,0019473 |
| | hepatopatía vs. MM | 2,2673E-09 | 7,6883E-06 |
| hsa-miR-26a | hepatopatía vs. ZZ sano | 5,0616E-06 | 0,00429094 |
| | hepatopatía vs. No hepatopatía | 0,0000808 | 0,0210699 |
| | hepatopatía vs. MM | 6,7574E-07 | 0,00057286 |
| hsa-miR-342-3p | hepatopatía vs. ZZ sano | 2,8709E-05 | 0,0139073 |
| hsa-miR-4507 | enfisema vs. zz sano (adultos) | 2,2163E-05 | 0,03757798 |
| hsa-miR-4530 | enfisema vs. MM | 1,1885E-05 | 0,02015176 |
| hsa-miR-4720-5p | enfisema vs zz sano (adultos) | 1,3456E-06 | 0,00456306 |
| hsa-miR-93 | zz sano vs mm | 2,53E-05 | 0,02859485 |
| | hepatopatía vs. No hepatopatía | 0,0002028 | 0,0404587 |
| | hepatopatía vs. MM | 3,9428E-06 | 0,00113195 |

5.2.3. Análisis de enriquecimiento funcional: análisis del conjunto de genes

Con el fin de evaluar cuáles eran las funciones diferencialmente representadas en los diferentes grupos, se realizó una serie de análisis funcionales del conjunto de genes con los resultados obtenidos de los test sin filtrar. En las siguientes tablas (XII-XIV) se recogen los resultados de los análisis efectuados con la base de datos experimental BioMart, y con la base de datos de predicción informática miRwalk.

La tabla XII muestra el número de procesos biológicos que está diferencialmente representado -infra o sobrerrepresentado-, en cada uno de los análisis y cada una de las bases de datos; si se observan, en ambas bases de datos, los análisis que han obtenido resultados, se ve que éstos son diferentes. Por ejemplo, en el análisis MS vs SZ en la base miR-gen diana validados, la regulación negativa de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II en respuesta al estrés del ER está infrarrepresentada, mientras que en la base de datos de los genes diana predichos, los procesos biológicos infrarrepresentados son: la traducción y el proceso biosintético de péptidos y amidas.

Tabla XII: Resultados de los análisis funcionales de los procesos biológicos en los diferentes análisis de expresión diferencial.

| | Procesos biológicos | | | |
|--------------------------------------|----------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | miR-gen diana validados | | miR-gen diana predichos | |
| | Infra | Sobre | Infra | Sobre |
| <i>enfisema.vs.mm</i> | 1 | 11 | 0 | 0 |
| <i>enfisema.vs.no_enfisema</i> | 2 | 1 | 0 | 0 |
| <i>enfisema.vs.zz_sano</i> | 3 | 2 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.mm</i> | 0 | 0 | 1 | 2 |
| <i>hepatopatía.vs.no_hepatopatía</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.zz_sano</i> | 2 | 1 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MZ</i> | 3 | 2 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.SZ</i> | 1 | 0 | 3 | 0 |
| <i>MS.vs.ZZ</i> | 1 | 0 | 1 | 2 |
| <i>MZ.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>MZ.vs.SZ</i> | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.ZZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.MM</i> | 1 | 27 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.ZZ</i> | 2 | 2 | 0 | 0 |
| <i>ZZ.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 1 |

En la tabla XIII se muestra el número de componentes celulares diferencialmente representados. Del mismo modo, al revisar los análisis con los que en ambas bases de datos se han obtenido resultados, éstos son diferentes. Por ejemplo, si comparamos los casos que desarrollan enfisema con los individuos control (MM), en la base de datos experimental obtenemos: estabilidad de los complejos de RNAm mediados por CDR, gránulo ribonucleoproteico y gránulo ribonucleoproteico citoplasmático, membrana y poro nuclear, mientras que en la base de datos bioinformática se obtienen: complejo empaquetamiento del DNA y nucleosoma.

Tabla XIII: Resultados de los análisis funcionales de los componentes celulares en los diferentes análisis de expresión diferencial.

| | Componente Celular | | | |
|--------------------------------------|---------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | miR-gen diana validados | | miR-gen diana predichos | |
| | Infra | Sobre | Infra | Sobre |
| <i>enfisema.vs.mm</i> | 0 | 5 | 0 | 2 |
| <i>enfisema.vs.no_enfisema</i> | 0 | 0 | 0 | 5 |
| <i>enfisema.vs.zz_sano</i> | 0 | 4 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.mm</i> | 0 | 3 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.no_hepatopatía</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.zz_sano</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MM</i> | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>MS.vs.MZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.SZ</i> | 5 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.ZZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.MM</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.SZ</i> | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.ZZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.MM</i> | 0 | 15 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.ZZ</i> | 0 | 7 | 0 | 0 |
| <i>ZZ.vs.MM</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |

En la tabla XIV se muestra el número de funciones moleculares diferencialmente representadas. Así, si revisamos los análisis que en ambas bases de datos han obtenido resultados, éstos son diferentes. Por ejemplo, en el análisis que compara los sujetos SZ y MM, en la base de datos validada obtenemos funciones relacionadas con la unión de las proteínas y del RNA, así como de la actividad de receptor de señal de exportación nuclear; sin embargo, en la base de datos con predicciones bioinformáticas, las funciones moleculares están relacionadas con la unión al DNA

Tabla XIV: Resultados de los análisis funcionales de las funciones moleculares en los diferentes análisis de expresión diferencial.

| | <i>Función molecular</i> | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | miR-gen diana validados | | miR-gen diana predichos | |
| | Infra | Sobre | Infra | Sobre |
| <i>enfisema.vs.mm</i> | 0 | 3 | 0 | 0 |
| <i>enfisema.vs.no_enfisema</i> | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>enfisema.vs.zz_sano</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.mm</i> | 0 | 3 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.no_hepatopatía</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.zz_sano</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MM</i> | 0 | 4 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.SZ</i> | 6 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.ZZ</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.MM</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.SZ</i> | 6 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.ZZ</i> | 2 | 1 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.MM</i> | 0 | 11 | 0 | 3 |
| <i>SZ.vs.ZZ</i> | 1 | 7 | 0 | 0 |
| <i>ZZ.vs.MM</i> | 0 | 2 | 0 | 0 |

En la tabla XV se muestra el número de rutas de señalización que están diferencialmente representadas. En este caso no existe ningún análisis en el que en se hayan obtenido resultados ambas bases de datos.

Tabla XV: Resultados de los análisis funcionales de las rutas de señalización en los diferentes análisis de expresión diferencial.

| | Rutas de señalización | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|-------|-------------------------|-------|
| | miR-gen diana validados | | miR-gen diana predichos | |
| | Infra | Sobre | Infra | Sobre |
| <i>enfisema.vs.mm</i> | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>enfisema.vs.no_enfisema</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>enfisema.vs.zz_sano</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.mm</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.no_hepatopatía</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>hepatopatía.vs.zz_sano</i> | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.MZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.SZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MS.vs.ZZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.SZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>MZ.vs.ZZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>SZ.vs.ZZ</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>ZZ.vs.MM</i> | 0 | 0 | 0 | 0 |

Como se ha detallado anteriormente, dependiendo de las anotaciones usadas, con el mismo análisis de expresión diferencial se obtienen distintos resultados. Ésto se explica porque, aunque se cuente con muchos datos, no se pueden aprovechar todavía para este tipo de análisis funcional. Así, si se utilizan los genes diana predichos bioinformáticamente se tiene más información pero, al utilizar estos datos las funciones están menos desequilibradas. Este tipo de análisis será probablemente muy interesante en el futuro, cuando se incremente el conocimiento disponible sobre las dianas de los microRNAs.

6. Resultados: RT-qPCR

6.1. Validación de los array mediante RT-qPCR

En la tabla XVI se muestran los datos demográficos de los pacientes en los que se validaron los datos del *array* mediante qPCR. Como se puede observar, el número de pacientes no es exactamente el mismo, al no haber podido disponer de plasma en algunos de ellos para volver a extraer el RNA con la adicción del miRNA exógeno cel-miR-54-3p, utilizado para la normalización de la expresión génica.

Tabla XVI: Datos demográficos de los pacientes de la validación. Expresado en media \pm desviación estándar.

| fenotipo (n) | MM (14) | MS (5) | MZ (12) | SZ (7) | ZZ (10) | p valor |
|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| riesgo | Controles | Bajo | Intermedio | Intermedio | Alto | |
| AAT mg/dL | 142,60 \pm 27,66 | 120,60 \pm 16,47 | 89,83 \pm 19,60 | 51,29 \pm 17,21 | 27,40 \pm 10,31 | < 0,0001 |
| Edad años | 33,36 \pm 20,21 | 24,80 \pm 17,27 | 23,00 \pm 17,46 | 39,71 \pm 25,66 | 25,10 \pm 16,84 | 0,4035 |
| Niño/adulto | 6/8 | 3/2 | 7/5 | 3/4 | 5/5 | 0,916 |
| Sexo (hombre/mujer) | 8/6 | 3/2 | 7/5 | 4/3 | 5/5 | 0,995 |
| enfisema | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0,054 |
| hepatopatía | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,407 |

En la tabla XVI se recoge la información clínica y demográfica de los sujetos de validación. En cuanto a las características demográficas (edad, proporción de niños/adultos y sexo), no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Respecto a las características clínicas, tampoco es significativo el desarrollo de enfisema o hepatopatía, ya que en la población de estudio se incluyen únicamente 2 pacientes que presentaban hepatopatía y 4 con enfisema.

6.1.1. Fenotipo

Se realizaron análisis de cada uno de los microRNAs que presentaban diferencias estadísticamente significativas en los *arrays*. En la tabla XVII se puede observar la expresión génica de los diferentes fenotipos de los microRNAs en los que las covariables -edad y sexo- no influyen en el modelo. En la figura 33 están representados gráficamente los microRNAs con diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes fenotipos en los que esas covariables no influyen.

El microRNA 93 incrementa su expresión en los individuos deficitarios (MS, MZ, SZ y ZZ), siendo la expresión diferencial entre los diferentes grupos estadísticamente significativa ($p=0,029$, tabla XVII). Al comparar el grupo control con el grupo ZZ ($p=0,0253$, Fig 33A), analizando las diferencias dos a dos, la expresión de este microRNA está significativamente aumentado. Por otra parte, los microRNAs 425 y 151a también tienen una expresión diferencial estadísticamente significativa entre los fenotipos ($p=0,016$ y $0,006$, respectivamente, tabla XVII), aumentando su expresión con la presencia del alelo Z y siendo mayor en homocigosis (p valores $0,0231$ y $0,0028$, respectivamente, Fig 33A y B).

Por otra parte, en la figura 34 se representan los gráficos con los efectos del fenotipo y las covariables significativas. El miR-107 tiene una expresión aumentada en las mujeres y en presencia del alelo Z (Fig. 34A), mientras que el miR-122 disminuye a medida que aumenta la edad, además de reducirse en los individuos deficitarios (Fig. 34B); let-7d incrementa la expresión con la edad y con el fenotipo SZ (Fig. 34C); y, por último, el let -7a aumenta con la edad, con el género masculino y con el fenotipo SZ (Fig. 34D).

Tabla XVII: Expresión de los diferentes miRNAs en función del fenotipo, en los análisis que las co-variables no son significativas. Expuesto como media \pm desviación estándar.

| FENOTIPO | | | | | | |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
| | MM | MS | MZ | SZ | ZZ | p valor |
| miR-17 | 0,748 \pm 1,201 | 0,542 \pm 0,899 | 0,504 \pm 0,674 | 1,545 \pm 2,123 | 1,688 \pm 2,111 | 0,240 |
| miR-24 | 0,652 \pm 0,694 | 0,855 \pm 0,678 | 0,619 \pm 1,010 | 0,163 \pm 0,338 | 0,271 \pm 0,357 | 0,175 |
| miR-93 | 0,064 \pm 0,121 | 0,239 \pm 0,350 | 0,208 \pm 0,302 | 0,273 \pm 0,228 | 0,446 \pm 0,550 | 0,029 |
| miR-150 | 3,237 \pm 3,041 | 2,098 \pm 2,295 | 4,205 \pm 5,440 | 3,006 \pm 3,063 | 1,149 \pm 1,428 | 0,789 |
| miR-191 | 0,127 \pm 0,158 | 0,154 \pm 0,231 | 0,179 \pm 0,309 | 0,326 \pm 0,402 | 0,518 \pm 0,711 | 0,375 |
| miR-342 | 0,330 \pm 0,473 | 0,233 \pm 0,327 | 0,310 \pm 0,523 | 0,481 \pm 0,455 | 0,350 \pm 0,566 | 0,680 |
| miR-425 | 0,024 \pm 0,049 | 0,032 \pm 0,071 | 0,131 \pm 0,169 | 0,230 \pm 0,257 | 0,276 \pm 0,256 | 0,016 |
| miR-4507 | No se expresa | No se expresa | No se expresa | No se expresa | No se expresa | 1 |
| miR-4530 | No se expresa | No se expresa | No se expresa | No se expresa | No se expresa | 1 |
| miR-4720-5p | No se expresa | No se expresa | No se expresa | No se expresa | No se expresa | 1 |
| miR-103a | 0,004 \pm 0,007 | No se expresa | 0,003 \pm 0,009 | 0,020 \pm 0,029 | 0,005 \pm 0,009 | 0,345 |
| miR-106a | 0,036 \pm 0,086 | 0,039 \pm 0,052 | 0,106 \pm 0,123 | 0,130 \pm 0,129 | 0,145 \pm 0,155 | 0,327 |
| miR-106b | 0,027 \pm | 0,119 \pm | 0,060 \pm | 0,091 \pm | 0,076 \pm | 0,106 |

| | | | | | | |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|--------------|
| | 0,067 | 0,245 | 0,079 | 0,157 | 0,108 | |
| miR-146a | 0,317 ± 0,610 | 0,032 ± 0,062 | 0,354 ± 0,596 | 1,131 ± 1,099 | 0,327 ± 0,311 | 0,148 |
| miR-151a | 0,005 ± 0,009 | 0,009 ± 0,014 | 0,056 ± 0,084 | 0,052 ± 0,065 | 0,101 ± 0,085 | 0,006 |
| miR-23a | 0,799 ± 1,299 | 0,323 ± 0,423 | 1,553 ± 1,947 | 2,826 ± 3,025 | 0,717 ± 1,130 | 0,154 |
| miR-23b | 0,065 ± 0,152 | 0,136 ± 0,303 | 0,107 ± 0,228 | 1,409 ± 0,228 | 0,505 ± 1,439 | 0,857 |
| miR-26a | 0,561 ± 0,646 | 0,195 ± 0,267 | 0,699 ± 0,974 | 0,640 ± 0,586 | 0,747 ± 0,867 | 0,656 |
| let-7c | No se expresa | 0,015 ± 0,034 | 0,009 ± 0,019 | 4,015E-5 ± 1,062E-4 | 0,011 ± 0,027 | 0,071 |

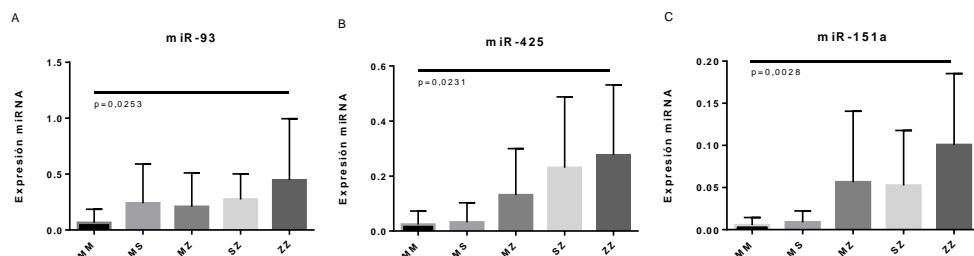
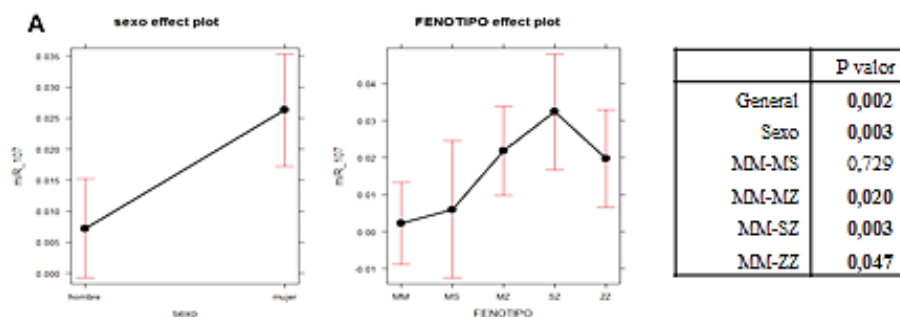


Figura 33. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del fenotipo. A) miR-93; B) miR-425; C) miR-151a.



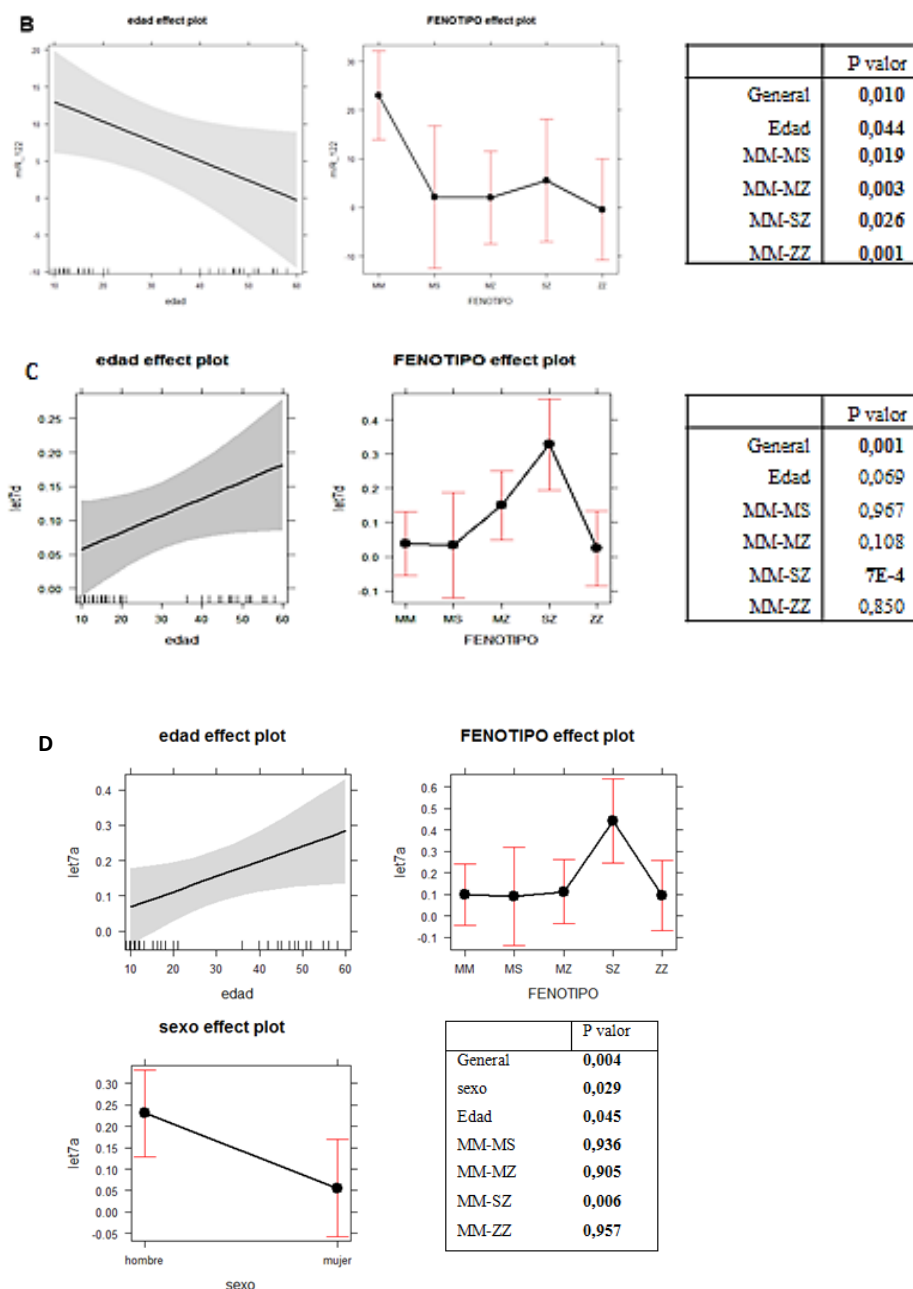


Figura 34. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del fenotipo, con co-variables significativas. A) miR-107; B) miR-122; C) let-7d; D) let-7a.

6.1.2. Enfisema

En estos análisis se han agrupado los pacientes únicamente en función de si habían desarrollado enfisema, o no. En el grupo sin patología se encuentran tanto individuos MM como pacientes deficitarios (MS, MZ, SZ y ZZ) que no habían desarrollado esta lesión pulmonar. Los microRNAs 17, 93 y 106a tienen una expresión mayor en el grupo de enfisema ($p=0,042$, $0,026$ y $0,045$, respectivamente) (tabla XVIII y Fig. 35).

Tabla XVIII: Expresión de los distintos microRNAs en función del desarrollo de enfisema pulmonar. Expresado en media \pm desviación estándar.

| ENFISEMA | | | |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| | NO | SI | p valor |
| miR-17 | 0,746 \pm 1,069 | 3,523 \pm 3,077 | 0,042 |
| miR-24 | 0,489 \pm 0,690 | 0,844 \pm 0,890 | 0,300 |
| miR-93 | 0,077 \pm 0,108 | 0,221 \pm 0,187 | 0,026 |
| miR-107 | 0,014 \pm 0,022 | 0,037 \pm 0,0361 | 0,073 |
| miR-122 | 8,540 \pm 18,882 | 0,270 \pm 0,220 | 0,256 |
| miR-150 | 2,860 \pm 3,669 | 3,142 \pm 2,722 | 0,699 |
| miR-191 | 0,211 \pm 0,340 | 0,731 \pm 0,876 | 0,125 |
| miR-342 | 0,293 \pm 0,410 | 0,872 \pm 0,860 | 0,088 |
| miR-425 | 0,110 \pm 0,161 | 0,391 \pm 0,383 | 0,061 |
| hsa-miR-4507 | No se expresa | No se expresa | 1 |
| hsa-miR-4530 | No se expresa | No se expresa | 1 |
| hsa-miR-4720-5p | No se expresa | No se expresa | 1 |
| miR-103a | 0,004 \pm 0,009 | 0,020 \pm 0,038 | 0,220 |
| miR-106a | 0,014 \pm 0,023 | 0,037 \pm 0,036 | 0,045 |
| miR-106b | 0,065 \pm 0,120 | 0,0747 \pm 0,138 | 0,505 |
| miR-146a | 0,446 \pm 0,707 | 0,214 \pm 0,180 | 0,653 |
| miR-151a | 0,040 \pm 0,065 | 0,102 \pm 0,111 | 0,083 |

| | | | |
|----------------|---------------|-------------------|-------|
| miR-23a | 1,279 ± 1,918 | 0,598 ± 0,963 | 0,602 |
| miR-23b | 0,403 ± 1,506 | No se expresa | 0,251 |
| miR-26a | 0,633 ± 0,752 | 0,467 ± 0,811 | 0,733 |
| let-7a | 0,156 ± 0,303 | 0,112 ± 0,125 | 0,519 |
| let-7c | 0,006 ± 0,019 | 7,03E-5 ± 1,40E-4 | 0,986 |
| let-7d | 0,114 ± 0,212 | 0,024 ± 0,033 | 0,986 |

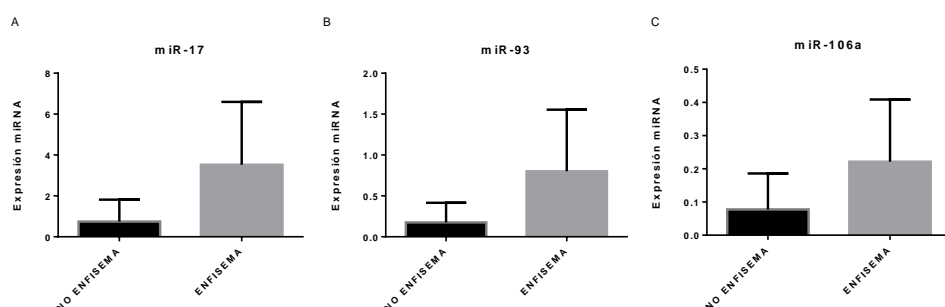


Figura 35. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del desarrollo de enfisema. A) miR-17; B) miR-93; C) miR-106a.

6.1.3. Hepatopatía

En esta sección se han agrupado los pacientes en función del desarrollo, o no, de hepatopatía. Al igual que en el análisis anterior, en el grupo “control” -sin hepatopatía-, se encuentran tanto individuos MM como pacientes deficitarios (MS, MZ, SZ y ZZ) que no presentan problemas hepáticos. Del mismo modo que el miR-107 está aumentado en las mujeres, como ya habíamos visto anteriormente, también lo está en los pacientes que han desarrollado hepatopatía (Fig. 36A). Además, el miR-23b o no se expresa, o tiene una expresión muy baja en los pacientes sin enfermedad hepática, mostrando -en cambio- niveles altos en presencia de hepatopatía, por lo que podría ser un buen biomarcador de

enfermedad hepática en pacientes con DAAT, al no existir solapamiento entre los grupos (Fig. 36B)(tabla XIX). Estos resultados tienen la limitación de que, en el análisis, sólo se incluyeron dos pacientes con enfermedad hepática.

Tabla XIX. Expresión de los distintos microRNAs en función del desarrollo de daño hepático. Expresado en media \pm desviación estándar.

| HEPATOPATIA | | | |
|------------------------|--------------------|-------------------------|--------------|
| | NO | SI | p valor |
| miR-17 | 0,995 \pm 1,541 | 1,032 \pm 0,624 | 0,454 |
| miR-24 | 0,504 \pm 0,713 | 0,873 \pm 0,429 | 0,215 |
| miR-93 | 0,225 \pm 0,352 | 0,372 \pm 0,278 | 0,323 |
| miR-107 | 0,013 \pm 0,021 | 0,073 \pm 0,014 | 0,008 |
| miR-122 | 8,083 \pm 18,560 | 2,281 \pm 1,951 | 0,535 |
| miR-150 | 2,940 \pm 3,644 | 1,609 \pm 0,594 | 0,703 |
| miR-191 | 0,248 \pm 0,419 | 0,429 \pm 0,606 | 0,897 |
| miR-342 | 0,334 \pm 0,485 | 0,601 \pm 0,387 | 0,215 |
| miR-425 | 0,135 \pm 0,200 | 0,171 \pm 0,242 | 0,858 |
| hsa-miR-4507 | No se expresa | No se expresa | 1 |
| hsa-miR-4530 | No se expresa | No se expresa | 1 |
| hsa-miR-4720-5p | No se expresa | No se expresa | 1 |
| miR-103a | 0,005 \pm 0,014 | No se expresa | 0,574 |
| miR-106a | 0,089 \pm 0,123 | 0,099 \pm 0,140 | 0,938 |
| miR-106b | 0,060 \pm 0,114 | 0,199 \pm 0,226 | 0,144 |
| miR-146a | 0,399 \pm 0,668 | 1,03 \pm 0,922 | 0,160 |
| miR-151a | 0,043 \pm 0,071 | 0,091 \pm 0,031 | 0,195 |
| miR-23a | 1,168 \pm 1,870 | 2,399 \pm 1,479 | 0,177 |
| miR-23b | 0,093 \pm 0,200 | 6,744 \pm 3,053 | 9E-4 |
| miR-26a | 0,635 \pm 0,760 | 0,258 \pm 0,365 | 0,512 |
| let-7a | 0,147 \pm 0,297 | 0,265 \pm 0,091 | 0,133 |
| let-7c | 0,007 \pm 0,019 | 5,668E-4 \pm 8,015E-4 | 0,606 |
| let-7d | 0,095 \pm 0,191 | 0,355 \pm 0,432 | 0,144 |

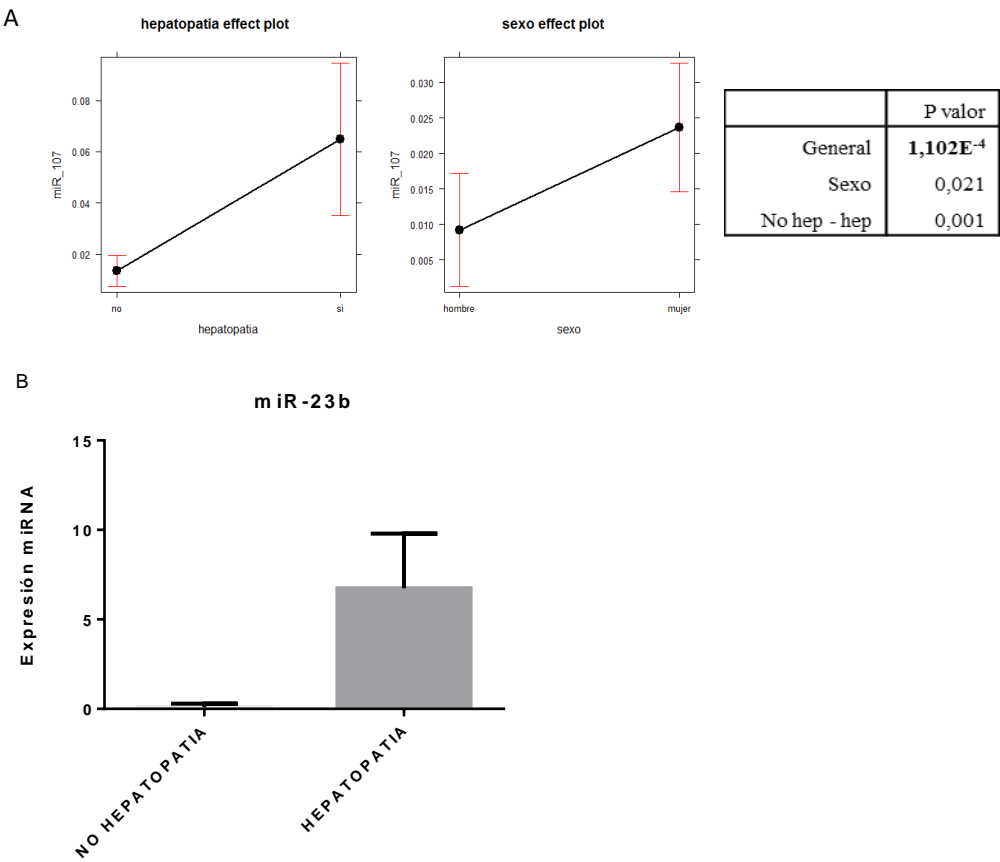


Figura 36. Gráficos de la expresión de los microRNAs en función del desarrollo de hepatopatía. A) miR-107; B) miR-23b.

6.2. Análisis de enriquecimiento funcional: análisis de sobrerrepresentación

En esta sección se presentan las conclusiones obtenidas después de realizar todos los análisis estadísticos mostrados anteriormente, más los análisis de sobrerrepresentación de estos microRNAs. Sólo se muestran las funciones que podrían estar ligadas con el déficit, sobre todo las pulmonares y hepáticas, ya que nuestra hipótesis plantea que el desequilibrio de los microRNAs procede de estos órganos, que son los implicados en la enfermedad.

- **El miR-122-5p** disminuye con la edad y con el déficit (fenotipos MS, MZ, SZ Y ZZ) (Fig. 34B). En la base de datos miRwalk 2.0 (226), se han encontrado 508 genes validados que están reprimidos por este microRNA. Comparando esta lista de genes con todo el genoma hallamos un componente celular y 968 procesos biológicos sobrerrepresentados en este grupo de genes. Como la expresión del microRNA 122 disminuye con la edad y el déficit, podemos interpretar que las funciones están sobrerrepresentadas con el déficit y al aumentar la edad (Fig. 26). No se ha realizado la curva ROC de este miR ya que la edad actúa como covariable. El componente celular estadísticamente significativo es el gránulo citolítico, con el 60% de los genes que lo regulan reprimidos (3 de 5). Un resumen de los procesos biológicos relacionados con el hígado y el pulmón se muestran en la figura 37 y, con más detalle, en la tabla S1 del anexo 4 donde, en los

procesos hepáticos, destaca la regulación de iones de cobre y hierro, glúcidos y lípidos y en los procesos pulmonares, el desarrollo pulmonar, además del estrés oxidativo y la apoptosis.

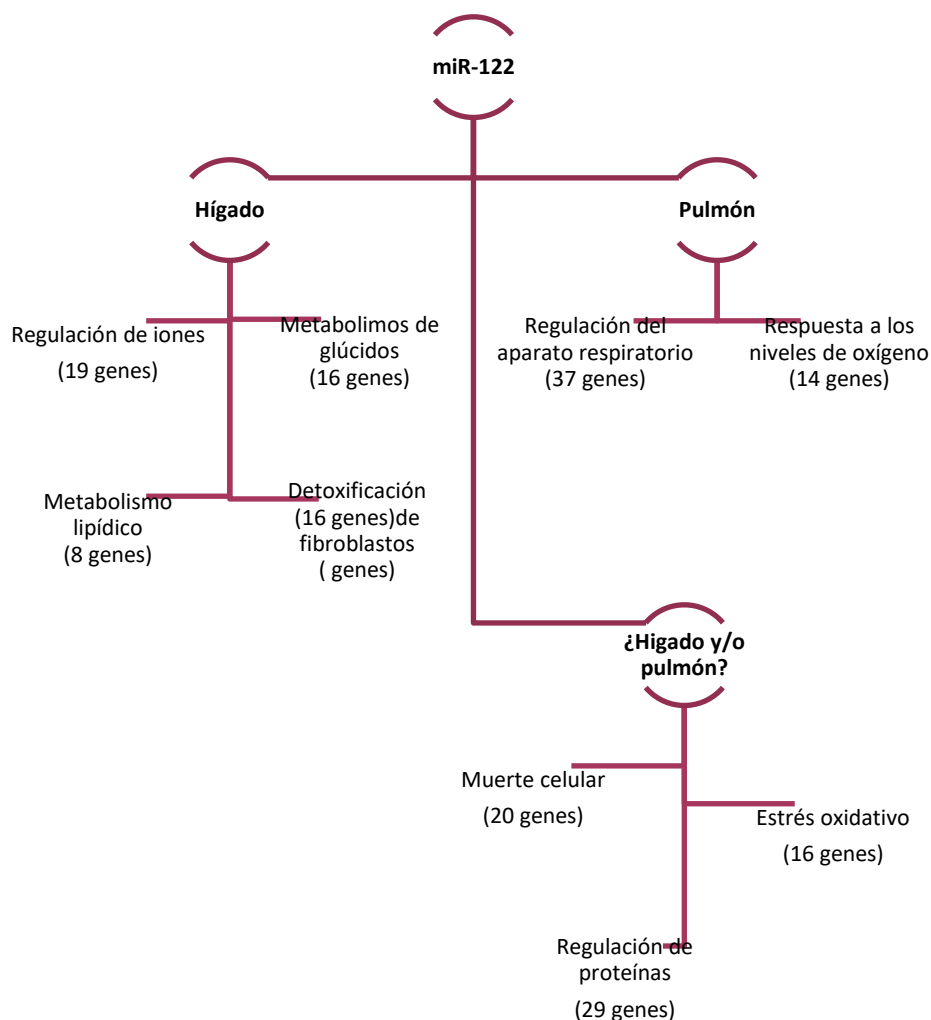


Figura 37. Esquema que muestra las funciones inhibidas por el miR-122, que se incrementan con la edad y presencia del déficit.

- **Los miR-425-5p y 151a-5p** aumentan su expresión con la presencia del alelo PiZ, siendo mayor para los homocigotos (figura 38). Al realizar las curvas ROC, ambos microRNAs serían unos biomarcadores no muy buenos de la presencia del alelo PiZ (Fig. 39). Los miR-425-5p y 151a-5p, en conjunto, tienen 188 genes diana validados (132 y 58 respectivamente). En el análisis funcional de los dos microRNAs se han obtenido 7 componentes celulares del que destaca el complejo ubiquitina ligasa cul7-RING (figura 40), y 387 procesos biológicos que son estadísticamente significativos. Los que se consideran más relevantes se muestran en la figura 41 y, con más detalle, en tabla S2. Las funciones de interés están relacionadas con los procesos pulmonares y hepáticos, además de la regulación de proteínas, sobre todo las implicadas en la degradación y plegamiento. A este respecto destaca la regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas implicadas en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina, que tiene inhibidos 9,09% de los genes implicados en esta función, lo que implica un descenso de ubiquitinación, que es un marcaje para la degradación, en este caso de proteínas, que suponemos podría estar implicado en la degradación del polímero de AAT. Estos microRNAs también regulan funciones relacionadas con el plegamiento de proteínas, chaperonas, y polimerización proteica.

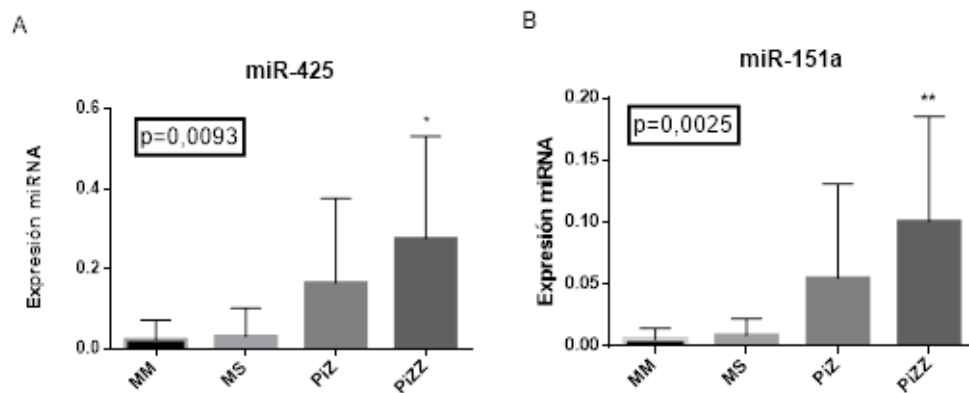


Figura 38. Expresión de A) miR-425 y B) miR-151a, en función de la presencia del alelo PiZ.

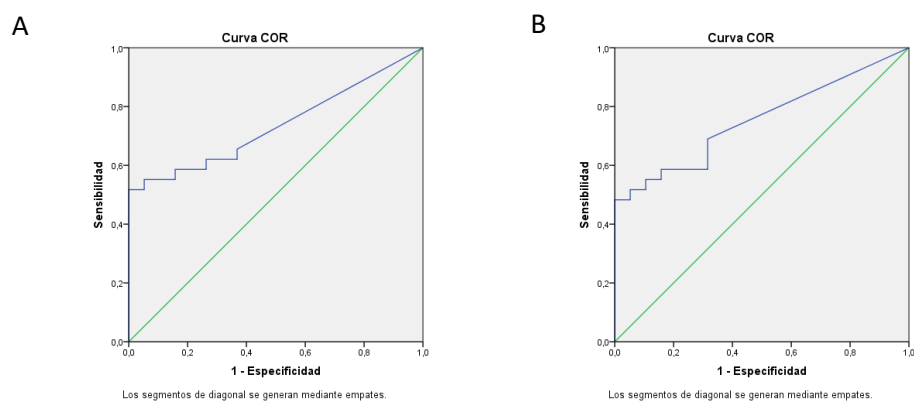


Figura 39. Curva ROC para la presencia del alelo PiZ. A) microRNA 151a, AUC=0,735. B) microRNA 425, AUC=0,752



Figura 40. Red que muestra los componentes celulares inhibidos por los microRNAs miR-151a y miR-425.

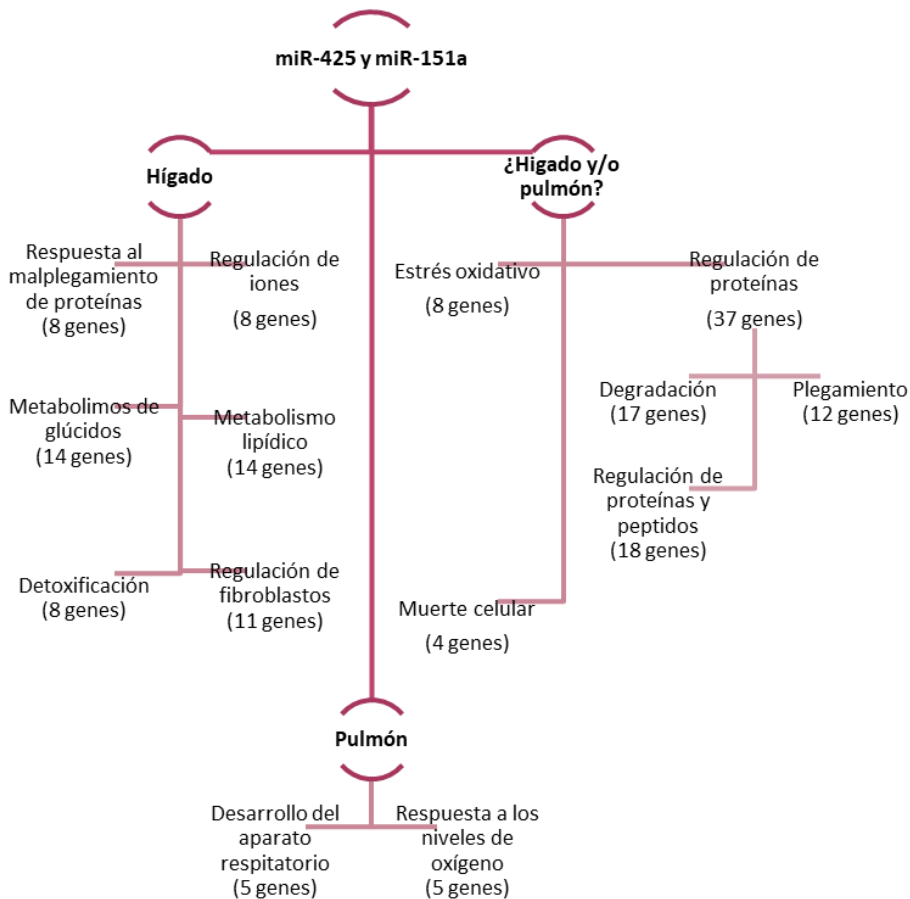


Figura 41. Esquema que muestra las funciones inhibidas por los miR-425 y 151a. Estas funciones están inhibidas en presencia del alelo PiZ.

- **El miR-93-5p** está incrementado en pacientes deficitarios (fenotipos MS, MZ, SZ y ZZ) y más alto cuando desarrollan enfisema (Fig. 42). Las curvas ROC muestran que este microRNA puede ser mejor biomarcador de existencia de enfisema que la presencia del alelo PiZ (Fig. 43), pudiéndose considerar buen biomarcador ya que su área bajo la curva (AUC) es mayor de 0,8.

Este microRNA tiene 1.179 genes diana validados que regulan dos componentes celulares (Fig. 44), aunque ninguno tiene relación directa con el DAAT, y 2.372 procesos biológicos, de los cuales los que pueden estar relacionados con el déficit se muestran en la figura 45 y en la tabla S 3.

En la regulación del desarrollo pulmonar este microRNA inhibe más de 25% de los genes implicados en la diferenciación de los neumocitos tipo I y II y, en menor medida, en la diferenciación de los otros tipos celulares del aparato respiratorio, como las células secretoras y epiteliales pulmonares.

Cabe destacar que la mayoría de las funciones que inhibe este microRNA están relacionadas con el sistema inmune, sistema íntimamente relacionado con el desarrollo de enfisema y que el miR-93 inhibe el 50% de los genes implicados en la regeneración tisular tras un proceso inflamatorio, el 40% de los genes implicados en la muerte de bacterias por neutrófilos, y al otro 40% de los que actúan en la inducción de tolerancia al antígeno propio. También está implicada en la regulación de leucocitos, interleuquinas, citoquinas y quimiocinas.

Por otro lado también controla la muerte celular, destacando la regulación negativa de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, involucrada en la vía de señalización apoptótica con más de un 28% de los genes implicados inhibidos, y la regulación positiva de la ruta de señalización apoptótica intrínseca en respuesta a daño del DNA, con un 25% de los genes implicados en ella inhibidos, resultando un total de 75 genes implicados en la muerte celular. Además, el estrés oxidativo también está controlado por este microRNA, con 42 genes inhibidos y silenciamiento génico por microRNAs con 14 genes inhibidos por el miR-93.

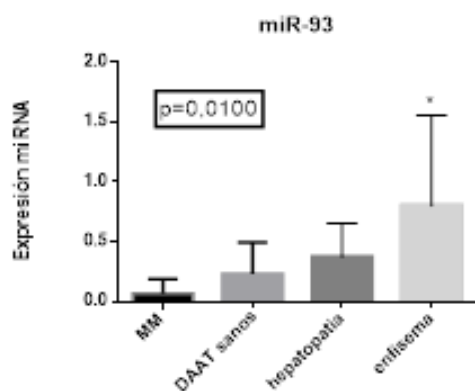


Figura 42. Expresión del miR-93.

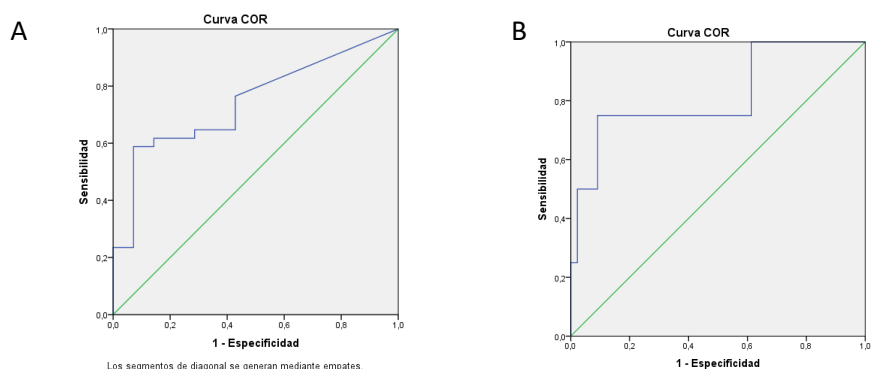


Figura 43. Curva ROC para el microRNA-93 de A) la presencia del déficit. AUC=0,744 y B) presencia de enfisema. AUC=0,818

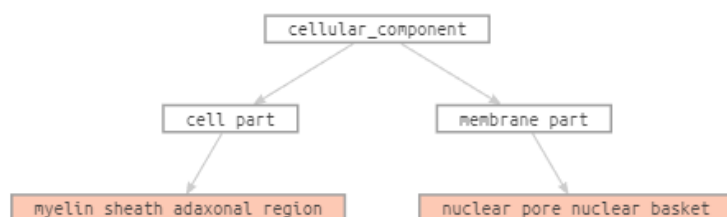


Figura 44. Red que muestra los componentes celulares inhibidos por el miR-93.

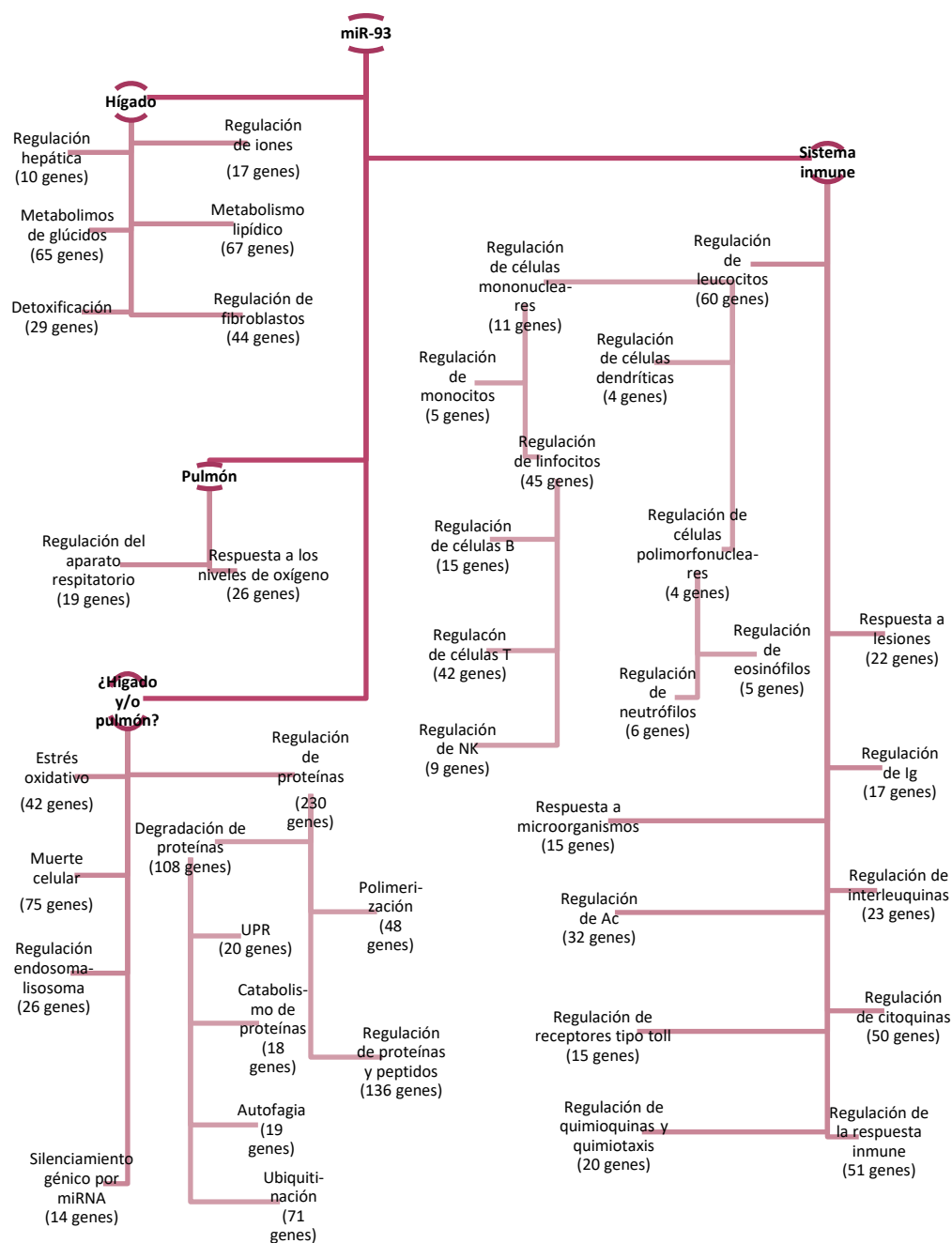


Figura 45. Esquema de las funciones inhibidas y del número de genes implicados por el microRNA 93.

- **Los miR-106a-5p y 17-5p** están aumentados en el enfisema (figura 35 A y C); ambos podrían ser utilizados como biomarcadores ya que el AUC de las curvas ROC en ambos casos es de 0,807 (Fig. 46).

El miR 106a tiene 666 genes diana validados implicados en el desequilibrio de 1.620 procesos biológicos y un componente celular, mientras que el miR-17 reprime a 1.134 genes distintos que regulan 2.513 procesos biológicos, un componente celular y dos funciones moleculares. En conjunto, inhiben 1.160 genes diferentes que regulan 2.097 procesos biológicos y 2 funciones moleculares (Fig. 47); en ambos, dos de los 5 genes implicados son diana de estos miRNA y un componente celular (Región adaxonal de envoltura de mielina, también con dos de los 5 genes inhibidos).

La figura 48 y la tabla S4 muestran un resumen de las funciones que regulan estos microRNAs y que pueden estar relacionadas con el déficit. Al igual que el miR-93, también aumentado en el enfisema, destacan las funciones relacionadas con el sistema inmune que regulan los leucocitos (proliferación, activación, adhesión, diferenciación, degranulación, apoptosis...) la producción de citoquinas, quimiocinas, interleuquinas; los receptores tipo toll, o la respuesta a los microorganismos, de los que cabe destacar la regulación de la respuesta inflamatoria crónica, con un 20% de los genes inhibidos.

Respecto al control del desarrollo pulmonar este microRNA inhibe más del 25% de los genes implicados en la diferenciación tanto de los neumocitos tipo I y II como, en menor medida, de los otros tipos celulares del aparato respiratorio como las células secretoras y epiteliales pulmonares, con un total de 25 genes implicados.

Además, destacan otras funciones relacionadas con la muerte celular con 90 genes implicados, y el estrés oxidativo, incluyendo la respuesta a vitaminas con 50 genes implicados y el silenciamiento génico, con miRNAs con 16 genes.

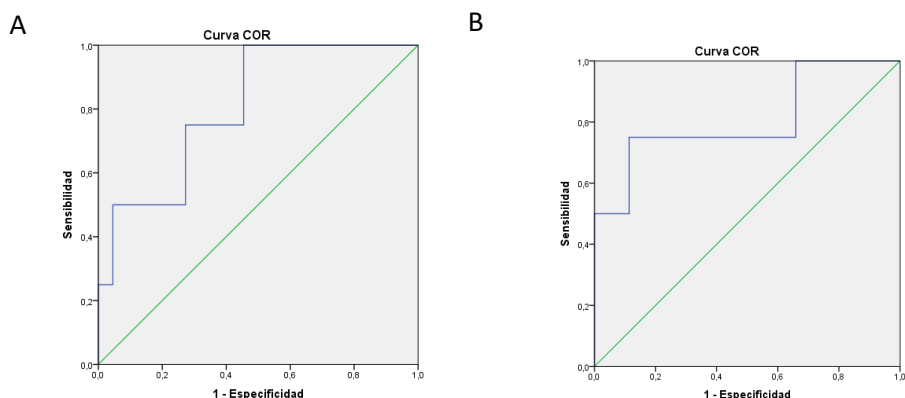


Figura 46. Curva ROC para la presencia de enfisema A) con el miR-106a.; AUC= 0,807 y B) con el miR-17; AUC=0,807.

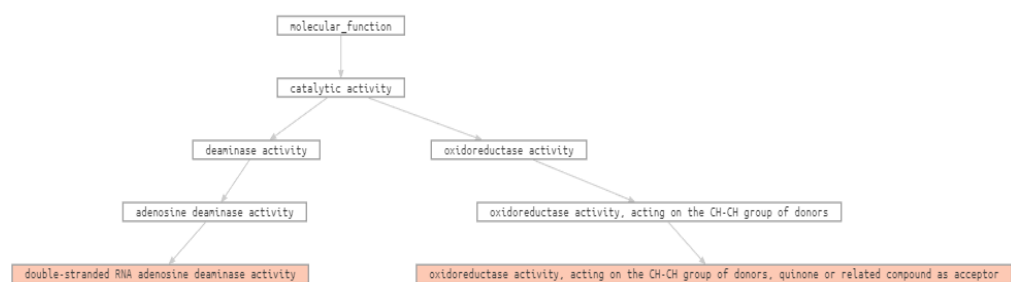


Figura 47. Red que muestra los componentes celulares inhibidos por los microRNA miR-106a y 17.

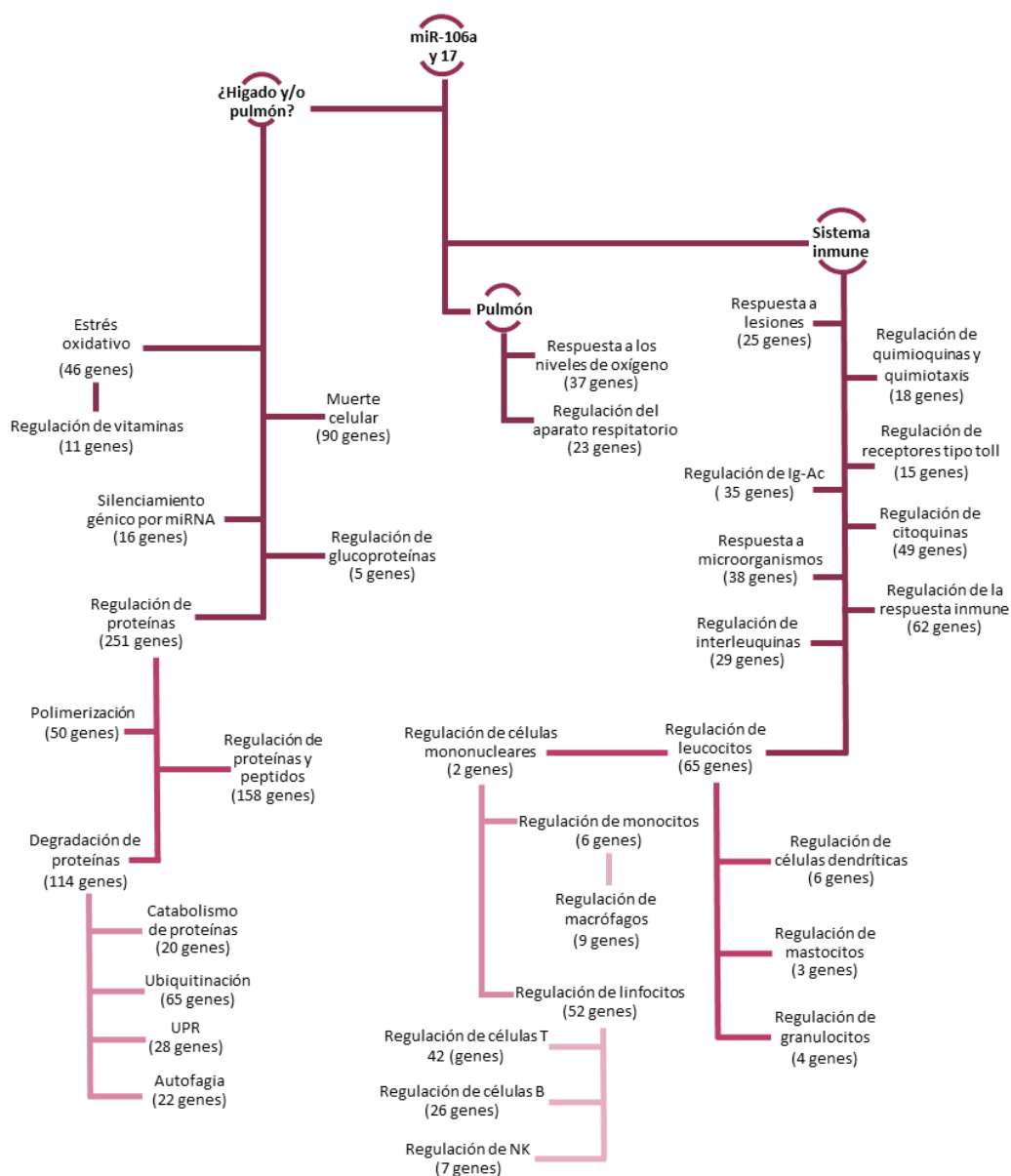


Figura 48. Esquema de las funciones inhibidas y del número de genes implicados por el microRNA 106a y 17.

- El **miR-107** está más elevado en mujeres, aumenta con la presencia del alelo Z y, sobretodo, con el desarrollo de enfermedad hepática (Fig.49). Se podría utilizar como biomarcador para la enfermedad hepática en el DAAT ya que el área bajo de la curva de la curva ROC es de 0,957 y no sería útil para la presencia del alelo PiZ, con un AUC de 0,740 (Fig. 50).

Este microRNA tiene 278 genes diana que influyen en 1.015 procesos biológicos. El miR está aumentado en mujeres y existen 10 genes diana que regulan la diferenciación sexual (Fig. 51 y tabla S 5). Entre las funciones que están reguladas por este microRNA también se encuentran funciones relacionadas con el desarrollo y funcionamiento hepático y pulmonar, así como con la regulación de proteínas y del sistema inmune, pero en una proporción muy baja comparada con la de los miR involucrados en el desarrollo de enfisema.

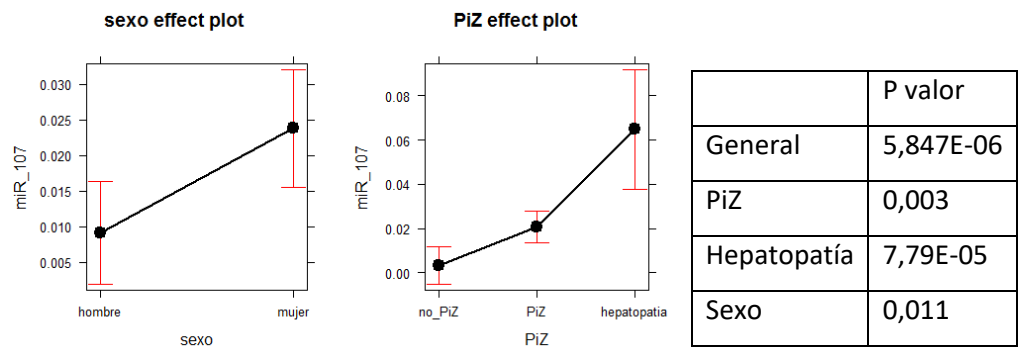


Figura 49. Gráficas de los efectos de la expresión génica del miR-107, tanto con el género como con la presencia del alelo PiZ y hepatopatía

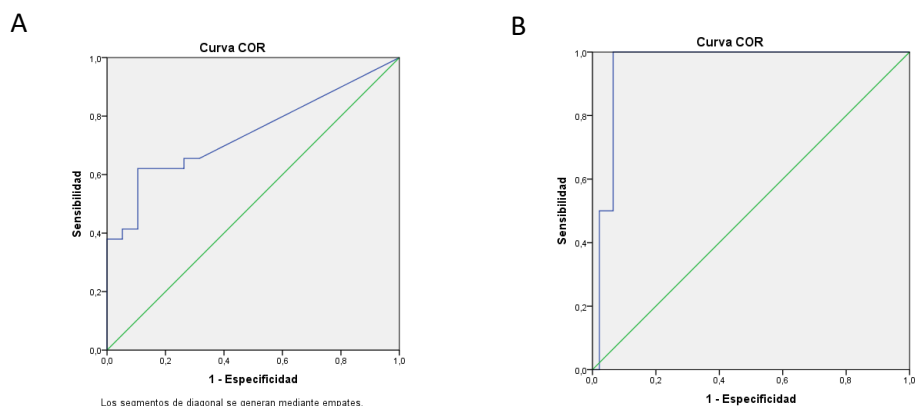


Figura 50. Curva ROC para el microRNA-107 A) frente a la presencia del alelo PiZ. AUC=0,740. B) frente a la presencia de hepatopatía. AUC=0,957

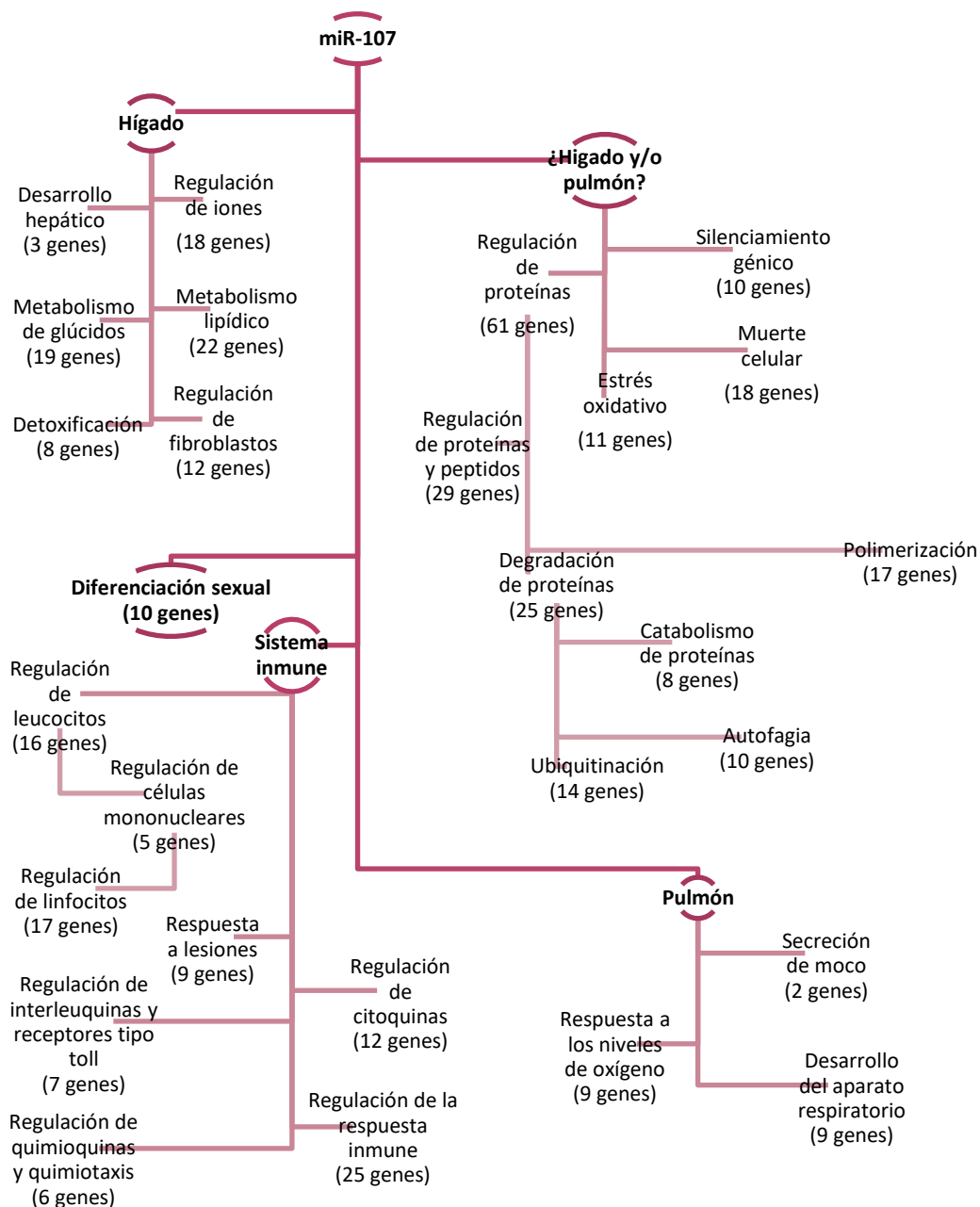


Figura 51. Esquema de las funciones inhibidas y del número de genes implicados por el microRNA 107.

- Por último, el **miR-23b-3p** podría ser un buen biomarcador de daño hepático en el DAAT, ya que no existe solapamiento entre su expresión en los pacientes con DAAT que desarrollan hepatopatía y los que no (Fig. 36B). Ésto se corrobora con la curva ROC que le da un 100% de especificidad y sensibilidad con un AUC de 1. (Fig 52).

Cuando se efectúa el análisis funcional de este microRNA se encuentran 302 genes diana que influyen en 799 procesos biológicos (Fig. 53 y tabla S 6). Entre las funciones que están reguladas por este microRNA también se encuentran algunas relacionadas con el desarrollo y funcionamiento hepático y pulmonar, así como con la regulación de proteínas y del sistema inmune pero, como ocurre en el miR-107 que también aumenta con la presencia de hepatopatía, lo hace en una proporción baja comparada con la de los miR involucrados en el desarrollo de enfisema.

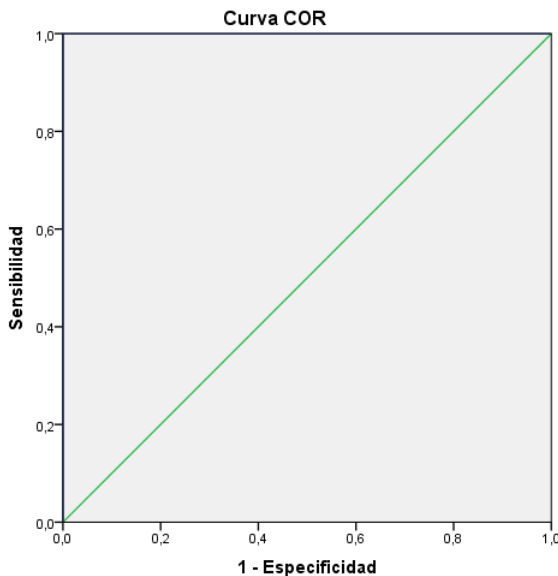


Figura 52. Curva ROC para el microRNA-23b frente la presencia de hepatopatía. AUC=1,00.

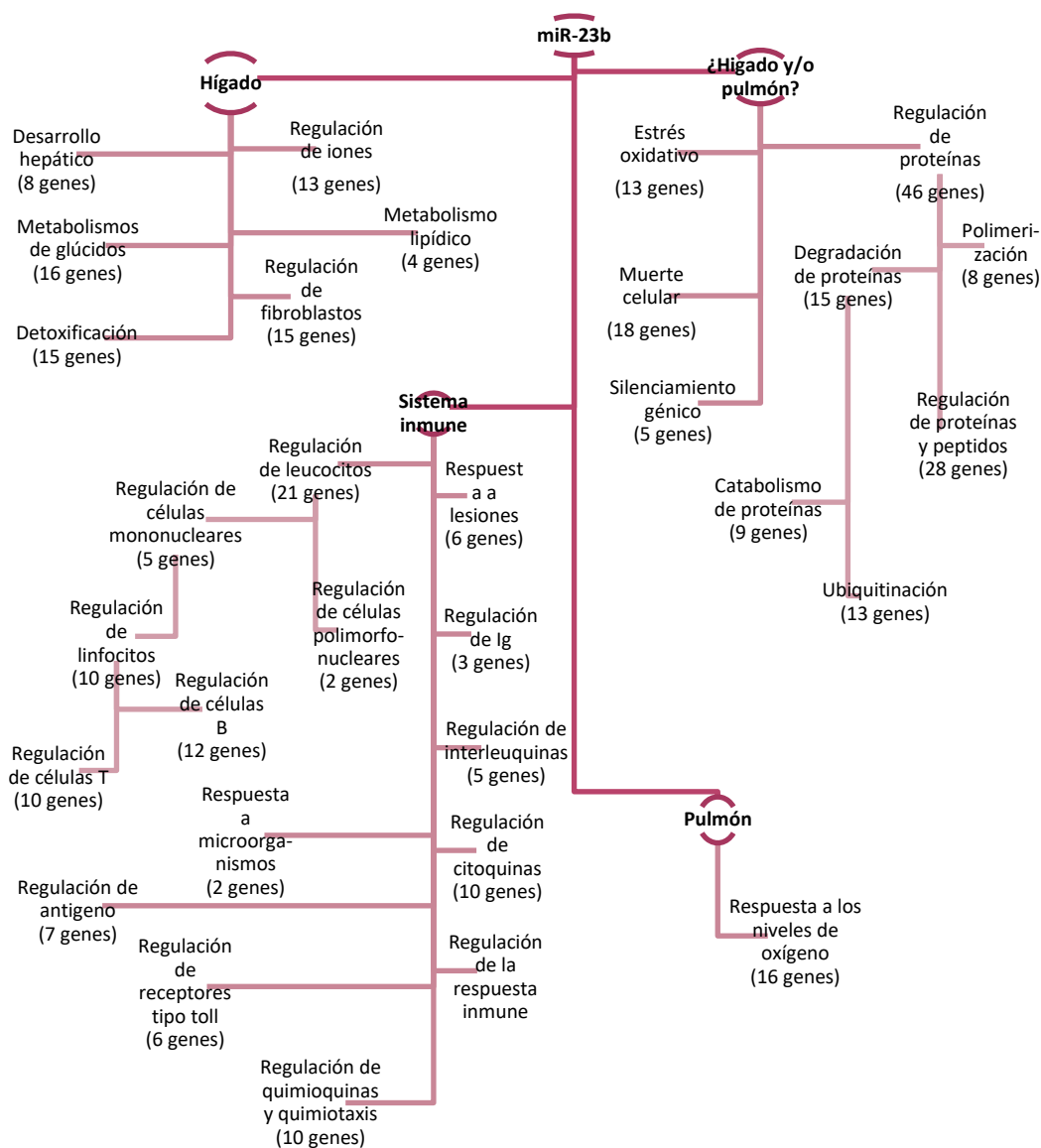


Figura 53. Esquema de las funciones inhibidas por el microRNA-23b y del número de genes implicados.

7. Discusión

En este trabajo se describen los microRNA circulantes en función de los diferentes fenotipos de AAT y las características clínico-patológicas de los pacientes con el objetivo de identificar patrones de expresión de microRNAs que puedan ser utilizados como biomarcadores diagnósticos y pronósticos en el DAAT.

Respecto a las **características clínicas**, nuestros resultados indican que existe mayor probabilidad de desarrollar enfisema en el grupo ZZ, aunque los parámetros espirométricos no sean estadísticamente significativos. Los sujetos pediátricos con DAAT no suelen desarrollar enfermedad pulmonar, la cual aparece en la edad adulta, sin embargo en nuestra cohorte hay un adolescente (17 años) con fenotipo SZ ya lo presentaba, pero este hecho aislado no es estadísticamente significativo; del mismo modo, los parámetros espirométricos no presentan diferencias estadísticamente significativas.

De manera similar, no existe, en nuestro grupo de estudio, diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere al desarrollo de enfermedad hepática, lo que podría explicarse, en parte, por el bajo tamaño muestral. En este sentido es importante resaltar, que existe un mayor riesgo de desarrollar hepatopatía durante el primer año de vida (Fig. 8) (1), aunque esto no se refleja en nuestra cohorte, ya que ninguno de los sujetos del estudio la padece; aún así, dos de las tres enzimas que miden la “salud” del hígado muestran un incremento estadísticamente significativo, aunque ninguno de ellos supere los límites de normalidad establecidos. El incremento en la GGT puede ser debido al incremento del estrés oxidativo y la baja concentración de glutatión que sufren los pacientes de DAAT (99), ya que la GGT actúan también juega un papel importante en la homeostasis del glutatión, descomponiendo el glutatión celular para proporcionar

cisteína (237), factor limitante en la síntesis *de novo* del glutatión (238), así el incremento de la GGT podría deberse a un intento de incrementar el glutatión.

En el pre-procesado de los datos obtenidos en los *arrays* en el *clustering* no supervisado no encontramos ninguna agrupación por características clínicas. Ésto podía ser previsible, ya que este estudio se centra en el análisis de los miR circulantes (239), debido a su gran potencial como bioamarcador, y no en el tejido afecto, donde posiblemente se encontrarían diferencias mayores, ya que los miRNA plasmáticos se originan no sólo a partir del tejido afecto. Por eso han sido necesarios varios abordajes en la expresión diferencial para poder encontrar microRNAs con diferencias de expresión sutiles entre los grupos.

En el estudio, no hemos encontrado ningún microRNA que pueda servir de biomarcador diagnóstico, pero sí algunos miRNAs que varían con el DAAT y que podrían favorecerlo. El miR-122 disminuye con la edad y con el DAAT, mientras que el miR-93 está incrementado en pacientes deficitarios. El alelo PiZ aumenta la expresión del miR-107, y los miR-425 y 151a también se sobreexpresan con la presencia de este alelo, siendo mayorer en homocigosis. Por otra parte, se han hallado tres miRNAs que pueden ser útiles como biomarcadores pronósticos de enfisema (106a, 17 y 93) y otros dos como biomarcadores pronósticos de hepatopatía (107 y 23b).

En nuestro conocimiento, sólo existe un trabajo anterior que haya estudiado el miRnoma en pacientes con DAAT, aunque este estudio no se hizo -como en nuestro caso-, en el suero circulante donde se encuentran miRNAs procedentes de cualquier órgano con mucha vascularización, sino en monocitos circulantes. En él se concluía que el miR-199a-5p es un importante regulador de UPR en los monocitos de pacientes con DAAT (240). Nuestro estudio podría tener, por ello,

una mayor utilidad clínica al ser realizado en muestras circulantes, no celulares, y tener microRNAs que pueden provenir del hígado y del pulmón. Aún así, precisamente porque se trata de una enfermedad rara, el reducido número de pacientes en algunos de los grupos impide obtener unos resultados más concluyentes.

Uno de los microRNAs que está diferencialmente expresado es el miR-122, disminuyendo su expresión con la edad y con el déficit (Fig. 34B). Este miR, como la mayoría de los microRNAs es específico de los tejidos y en concreto, se expresa mayoritariamente en el hígado, con unas 135.000 copias de media por hepatocito en cultivo primario humano (241). Representa más de la mitad de la expresión del miRnoma hepático con el 52%, seguido del miR-192 (17%) y miR-199a/b-3p (5%) (242). Varios estudios han demostrado que el miR-122 desempeña un papel esencial en el mantenimiento y diferenciación del hígado, y que su pérdida induce proliferación de los conductos oval y biliar, así como hepatocarcinoma celular (HCC) con la edad (243).

Un estudio realizado por Waidmann *et al.* muestra una reducción de los niveles de miR-122 en pacientes con diferentes hepatopatías que se asociaban con la supervivencia, independientemente de la puntuación MELD (modelo de enfermedad hepática terminal), de la edad y del sexo (244)

Este miRNA es también uno de los más estudiados en el metabolismo lipídico. Su inhibición por oligonucleótidos antisentido disminuye los niveles de colesterol en ratones con dieta rica en colesterol (245) y triglicéridos (246, 247); también activa el AMPK (proteína quinasa activada por AMP) que aumenta la oxidación de los ácidos grasos y la inhibición de la síntesis del colesterol en el hígado (248). Existen estudios que muestran un incremento de la fibrosis acompañada de

esteatohepatitis y posteriormente, de tumores hepáticos en ratones *knockout* para el miR-122 (246, 247). Aunque se desconocen muchos detalles, el miR-122 está involucrado en otras funciones incluyendo el desarrollo hepático, la patogénesis del virus de la hepatitis B, los ritmos circadianos y el metabolismo del hierro, entre otros (Fig. 54) (249). En el análisis funcional de nuestro estudio también hemos detectado una implicación del miR-122 en el desarrollo y homeostasis hepática, en el metabolismo de los lípidos y en la regulación de iones (Fig. 37 y tabla S1)

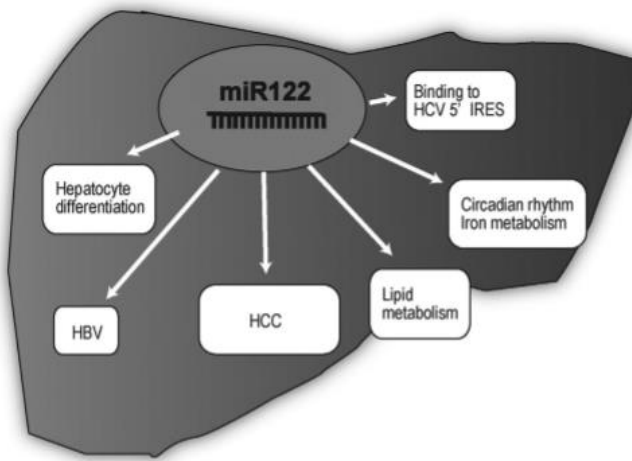


Figura 54. Funciones hepáticas reguladas por el miR-122 (249).

Por otra parte, el sistema ubiquitina-proteasoma regula la degradación de las proteínas y está involucrado en múltiples procesos celulares como la proliferación celular, la apoptosis, la migración y capacidad invasiva y el ciclo celular. Hay tres enzimas implicadas: la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima de conjugación de la ubiquitina (E2) y la ubiquitina ligasa (E3). Específicamente, las moléculas de ubiquitina son activadas por la enzima E1 utilizando ATP; luego transferidas a la enzima E2 y, posteriormente, unidas por las ligasa E3. El complejo

E3 se une a las proteínas sustrato y las guía a su degradación por los proteasomas 26S (250).

La especificidad del sustrato para la ubiquitinación está controlada -en gran parte- por la ligasa E3. Existen aproximadamente 600 E3 ligasas; se dividen en familias según su homología de secuencia de proteína, incluyendo la familia HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*), la familia de dedos RING (*Really Interesting New Gene*) y la familia REB (*Ring-between-ring*). En el tipo RING de E3 ligasas, el complejo SCF (Skp1-Cullin1-F-box) ha sido bien estudiado. Se sabe que está constituido por la proteína estructural Cullin1, la proteína finger Rbx1, la proteína Skp1 (proteína asociada a la quinasa en fase S 1) y la proteína F-box. La función de la Rbx1 es reclutar la enzima E2, mientras que la Skp1 se une a las proteínas F-box que son las encargadas de reconocer los sustratos cuando se modifican adecuadamente (250).

En el análisis funcional de la presencia del alelo PiZ hemos obtenido el complejo ubiquitina ligasa cul7-RING, como uno de los componentes celulares con la función inhibida. El microRNA que lo inhibe es el 151a y la represión esta mediada por la inhibición del gen SPK1 que solamente está reprimido por el miR 151a y no por el miR-425.

Por otra parte, existen diferentes hipótesis sobre cuál es la fisiopatología de la EPOC. Una de las más extendidas es que el estrés oxidativo, el desequilibrio proteasa-antiproteasa y la inflamación, son los tres factores principales en su desarrollo (251). Además existe una interrelación entre estos tres factores. Como se muestra en la figura 55, las ROS (especies reactivas del oxígeno) incrementan la inflamación (252), lo que aumenta -a su vez-, el número de neutrófilos en el pulmón que -al secretar más proteasas-, aumentan el desequilibrio proteasa-

antiproteasa, ya de por sí desequilibrado en los pacientes con DAAT. Se ha estudiado mucho el estrés oxidativo en la EPOC dado que el mayor factor de riesgo para su desarrollo es el tabaco, debido a la producción de radicales libres (253). Concretamente, en pacientes con DAAT, se hace mucho hincapié en la erradicación del hábito tabáquico (por su mayor riesgo de sufrir enfermedad pulmonar) pero, aunque no fumen, los pacientes con DAAT tienen un estrés oxidativo más elevado que las personas sanas (99). En un estudio llevado a cabo por Gupta *et al.* se demuestra que el humo del tabaco oxida directamente las proteínas, además de desencadenar la mayor ruta de señalización inflamatoria inducida por él mismo (Rtp801/NFκβ/iNOS) y que el ascorbato (vitamina C), además de sus propiedades antioxidantes, también suprime la expresión de estas proteínas pro-inflamatorias. Sin embargo, la suplementación con ascorbato a coballas, después de la exposición al humo, no mejora el daño. Con esto se puede concluir que la vitamina C, molécula antioxidante, funciona como medida preventiva y no curativa contra el humo del tabaco y probablemente, contra el estrés oxidativo (254). Tal y como hemos demostrado en estudios realizados por nuestro grupo de investigación, los pacientes con DAAT tienen un estrés oxidativo circulante aumentado (99, 255) que puede conllevar un incremento de la inflamación, lo que sumado al desequilibrio proteasa-antiproteasa podría conducir al desarrollo de enfisema pulmonar.

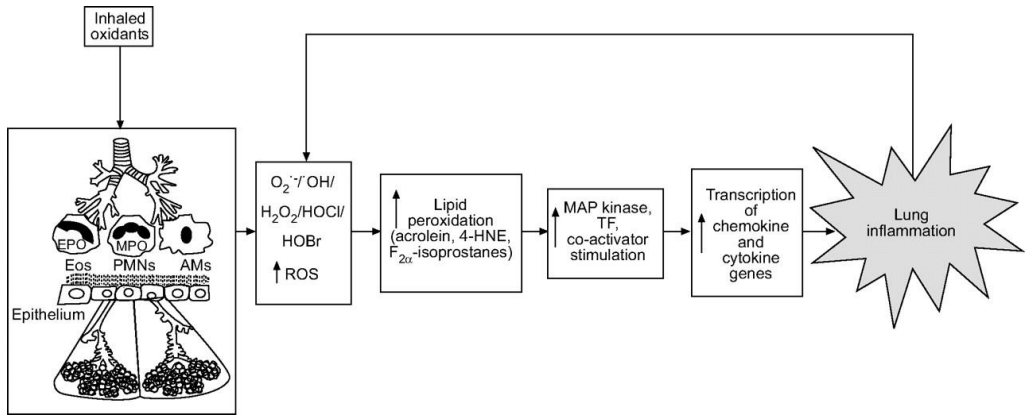


Figura 55. Mecanismo de inflamación pulmonar mediada por ROS. (252)

Por todo ello planteamos, que los microRNAs que están aumentados en los pacientes con enfisema pulmonar (miR-17, 93 y 106a, Fig. 35), regulan funciones implicadas en el estrés oxidativo y la inflamación. Además, todos estos microRNAs pertenecen a la misma familia (182) y están codificados en *clusters* parálogos. Un *cluster* se define como varios genes, en este caso de microRNAs, localizados de forma adyacente en el cromosoma; se transcriben en un mismo pri-miRNA y se procesan individualmente a pre-miRNA (256). El miR-17 pertenece al *cluster* miR-17~92 formado por 6 microRNAs y codificado en el cromosoma 13; el miR-106a se encuentra en el *cluster* miR-106a~363, formado también por 6 miR y codificado en el cromosoma X; y por último, el miR-93 se encuentra codificado en el *cluster* miR106b~25, en el cromosoma 7 y consta de 3 microRNAs (257). Los *clusters* de miRNA al transcribirse a la vez, suelen estar involucrados en inhibir las mismas funciones.

En nuestro estudio observamos que el miR-93 se incrementa con el déficit (fenotipos MS, MZ, SZ y ZZ) y, más aún, en presencia de enfisema. Un estudio

realizado por Sing *et al.* muestra que el miR-93 regula el estrés oxidativo, ya que tiene como gen diana el antioxidante *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2). Su incremento disminuye la expresión de las proteínas NRF2: NADPH quinona oxidoreductasa y superóxido dismutasa 3. Además, en el mismo estudio, se demuestra que -en las líneas celulares MCF-10A y T47D-, un incremento del miR-93 aumenta el daño oxidativo al DNA por el marcador 8OHdG (258). Esto va en concordancia con un estudio previo de nuestro grupo que muestra que individuos pediátricos sanos con DAAT tienen un estrés oxidativo aumentado, con un incremento del daño oxidativo en el DNA (99).

Los tres microRNAs siguientes miR-93, 106a y 17 están implicados en procesos inflamatorios mediante la inhibición directa del RNAm de la IL8 (259-261) citoquina pro-inflamatoria, y una quimiocina CXC involucrada en diversas patologías pulmonares (262) (262). Además, estos tres microRNAs tienen, como gen diana, al FBXO31 (263, 264). FBXO31 forma parte de la ubiquitina E3 ligasa, y posee una gran variedad de genes diana como la ciclina D1, MDM2, p38 y Ctd1 que promueven su degradación proteasomal mediada por poliubiquitinación (263) con lo que su presencia en individuos con enfisema podría estar relacionada con la inflamación y la polimerización de la AAT que favorece el desarrollo de enfisema

Por otra parte, hemos detectado una sobreexpresión de miR107 y 23b en los individuos con hepatopatía (Fig. 36). El miR-107 aumenta además, en mujeres y en presencia del alelo PiZ. La diferencia de expresión en las mujeres se ha observado en un estudio realizado por Miao *et al.* donde se sugiere que regula específicamente el desarrollo del ovario mediante la regulación post-transcripcional de NR5a1 (*nuclear receptor subfamily 5 group A member 1*) y CYP19A1 (*cytochrome P450 family 19*

subfamily A, polypeptide 1) en las vías de señalización de estrógenos de pollos (265).

En cuanto a la función hepática, existen estudios que proponen al miR-107 como regulador del metabolismo lipídico, aunque -dentro de esta función global- existen discrepancias respecto al mecanismo de acción que lo regula. Un estudio realizado por García *et al.* propone a la proteína reguladora del elemento regulador del colesterol 1 (SREBP1) y a la carnitina palmitotransferasa 1a (CPT1a), como genes diana del miR-107, pero no de la sintasa de ácidos grasos (FASN), que estaría regulada por el miR-122 (266). Sin embargo, otro estudio postula a la FASN como gen diana del miR-107 y responsable de desencadenar la respuesta al estrés del RE y del acumulo de lípidos en los hepatocitos (Fig. 56) (267), con lo que el aumento de estrés microRNA en pacientes con DAAT puede promover -aún más- la respuesta al estrés del RE, al contar con otro factor desencadenante: el acúmulo de la proteína AAT malplegada y, junto con la acumulación lipídica, provocar el daño hepático.

Por otra parte, los AINES incrementan el daño hepático en ratones PiZ, aumentando: la proliferación de hepatocitos, la activación de la caspasa 9, el RNAm del gen *SERPINA1* y, por lo tanto, la acumulación del polímero Z-AAT (149). El mecanismo de acción de los AINES es la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (268). La COX-2 reprime el miR-23b en los hepatocitos, aumentando la DEAD-box helicasa (p68 DDX5), siendo la COX-2 un factor protector frente a la lesión hepática aguda al aumentar la proliferación temprana y ejercer un efecto antiapoptótico-antinecrotico (269). Combinando los dos estudios podemos deducir que la administración de AINES disminuye la COX-2 y, consecuentemente, su efecto anti-muerte en los hepatocitos. La COX-2 inhibe el miR-23b, con lo que -al disminuir la COX-2- aumenta el miR-23b, como hemos visto en nuestros pacientes con

hepatopatía y como demuestra el estudio de Rudnick *et al.*, en ratones PiZ a los que se les administra AINES y tienen mayor daño hepático (149).

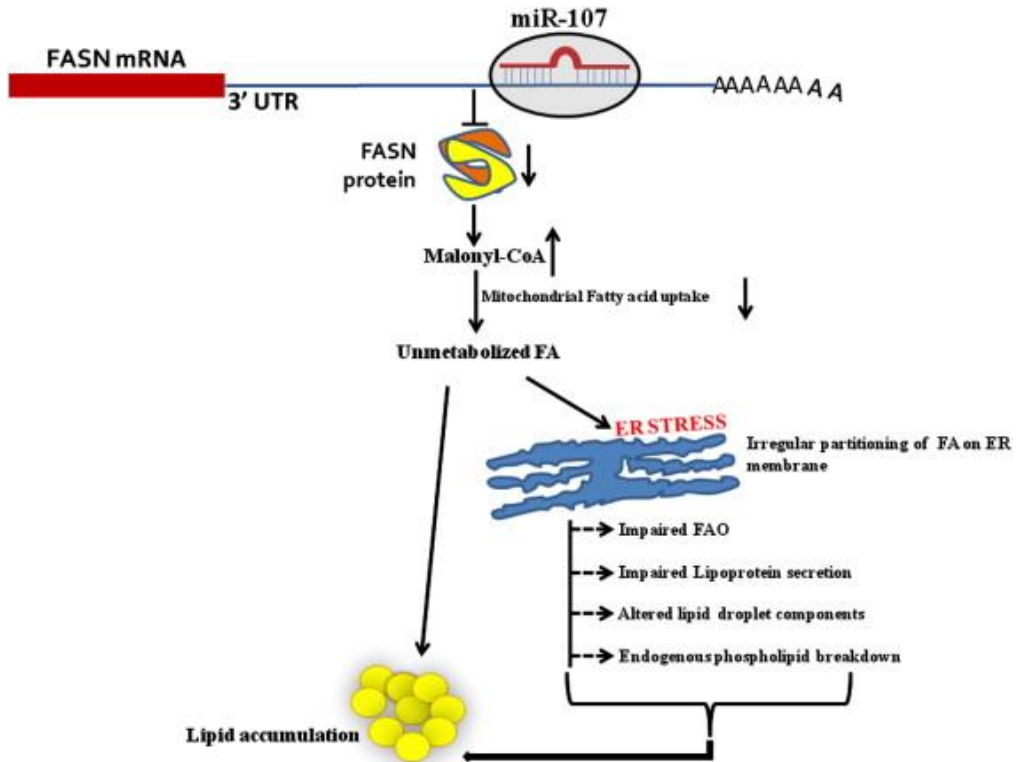


Figura 56. Mecanismo de acción propuesto por Bathia *et al.* por el cual el miR-107 inhibe a la sintasa de ácidos grasos, provocando estrés del RE y acumulación lipídica en el hígado (267).

En definitiva, en nuestro estudio se han identificado una serie de patrones de expresión de microRNA que podrían ser utilizados como biomarcadores pronósticos de enfisema y hepatopatía. Estos mismos microRNAs podrían ser útiles en la valoración del tratamiento. A los pacientes que reciben tratamiento sustitutivo, se les podría medir la expresión de los miRNAs sobreexpresados en el

enfisema (93, 17 y 106a) y comprobar si el tratamiento, disminuye sus niveles, a la vez que frena el daño pulmonar existente.

Por último, al encontrar funciones diferencialmente representadas y genes inhibidos por el desequilibrio en los microRNAs, se podrían fijar nuevas dianas terapéuticas, como por ejemplo el gen *SKP1* reprimido por el miR-151a, que podría ser útil en la degradación de la proteína AAT acumulada en el hígado.

.

8. Limitaciones del estudio

Reconocemos que este estudio tiene limitaciones. Primero, el número de sujetos fue relativamente pequeño debido a que el DAAT es una condición genética rara, y además infradiagnosticada, lo que puede haber resultado en un poder insuficiente para detectar significatividad estadística para alguna de las preguntas del estudio, aunque los valores *p* indica una diferencia o correlación significativa. En segundo lugar, no pudimos investigar las diferencias en las variables ambientales, sobre todo el consumo de tabaco, que potencialmente puede influir en los resultados.

Por ello, a partir de los resultados obtenidos, hemos querido calcular el número de pacientes necesarios para poder ser validados en una nueva cohorte. El cálculo de la población de estudio se ha realizado con el software Ene 2.0 (GlaxoSmithKline) y los resultados se muestran en la tabla XX. Los cálculos se han realizado para una potencia capaz de detectar diferencias en el contraste de la hipótesis nula del 80,0%, un nivel de significación del 5%, y asumiendo que la variabilidad entre los grupos se ajusta a nuestros resultados.

Tabla XX: Estimación del número de pacientes necesario para cada uno de los microRNAs significativos en una nueva cohorte de validación.

| microRNA | MM | MS | PiZ | PiZZ | ZZsanos | enfisema | hepatopatía |
|----------|----|----|-----|------|---------|----------|-------------|
| 425 | 17 | 10 | 12 | 10 | - | - | - |
| 151a | 15 | 9 | 11 | 9 | - | - | - |
| 107 | 12 | - | - | - | 8 | 6 | 6 |
| 93 | 12 | 6 | 12 | - | 12 | 9 | - |
| 106a | 22 | - | - | - | 20 | 18 | - |
| 17 | 11 | - | - | - | 10 | 9 | - |
| 23b | 7 | - | - | - | 7 | - | 7 |

En resumen, para poder validar todos los microRNAs que han demostrado tener diferencias estadísticamente significativas como posibles biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina, se necesitaría estudiar una nueva cohorte de 99 sujetos, distribuidos en 22 pacientes MM, 10 MS, 12 PiZ (6MZ y 6SZ), 20 ZZ sanos, 18 con enfisema y sin tratamiento y 7 con hepatopatía.

9. Conclusiones

- El análisis funcional del conjunto de genes es una herramienta prometedora en el futuro, cuando se tenga más información de todos los miRNAs.
- La firma de microRNAs circulantes varía en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina, lo que podría ser útil para el **diagnóstico**:
 - La expresión del **miR-122** disminuye con la **edad** y con el **DAAT** (fenotipos MS, MZ, SZ y ZZ). Este miR es principalmente hepático, donde representa la mitad del miRnoma.
 - La expresión del **miR-93** está incrementada en los **pacientes deficitarios** (fenotipos MS, MZ, SZ y ZZ).
 - La expresión del **miR-107** se encuentra más elevada en mujeres y aumenta con la presencia del alelo PiZ.
 - Los **miR-425** y **151a** aumentan su expresión con el alelo **PiZ**, siendo en este caso mayor en homocigosis. El miR-151a inhibe el complejo ubiquitina ligasa cul7-RING a través del gen *SKP1* que forma parte del sistema ubiquitina-proteasoma cuya función es regular la degradación de las proteínas.
- Los microRNAs pueden utilizarse como **biomarcadores** para el **pronóstico** del DAAT pero, aunque todos estos resultados son prometedores, hay que tomarlos con cautela ya que es necesaria su validación con una cohorte más grande.
 - Existen 3 microRNAs (**17, 106a y 93**) que están elevados en los pacientes con **enfisema** pulmonar. Estos 3 miR pueden ser buenos

biomarcadores pronósticos ya que, en todos casos, su área bajo la curva es mayor de 0,8. Los análisis funcionales muestran que estos miRNAs regulan el desarrollo pulmonar, el estrés oxidativo y el sistema inmune.

- Los **miR-107** y **23b** están incrementados en pacientes con **hepatopatía**. Ambos microRNAs serían buenos biomarcadores de enfermedad hepática, ya que el área bajo la curva de ambos es mayor de 0,8, mientras que el miR-23b alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad.
- Los microRNAs podrían tener utilidad en el control del efecto terapéutico de la AAT intravenosa, en los pacientes tratados, corroborando su efectividad cuando, a lo largo del mismo, revirtiera su expresión a los niveles del grupo control.

- Functional over representation analysis will be a promising tool in the future, when more information in all miRNAs will be available.
- Circulating microRNA signature varies in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency, which can be useful for diagnosis:
 - **miR-122** expression decreases with **age** and with **AATD**. This miR is mainly hepatic, and represents half of its miRnoma.
 - **miR-93** expression is augmented in **AATD** patients.
 - **miR-107** expression is raised in women and subjects carrying PiZ allele.
 - **miR-425** and **151a** increase their expression with the presence of the **PiZ** allele, being greater in homozygotes. MiR-151a inhibits the 7-RING ubiquitin ligase complex through the *SKP1* gene that is part of the ubiquitin-proteasome system, whose function is to regulate protein degradation.
- MicroRNAs can be used as **AATD prognostic biomarkers**, however these results are promising, but they must be taken with caution since it is necessary a validation with a larger cohort
 - There are 3 microRNAs (**17, 106a and 93**) which are elevated in patients with pulmonary **emphysema**, these 3 miR can be good prognostic biomarkers because, in all cases, their area under the curve are greater than 0.8. Functional analyses show that these miRs regulate lung development, oxidative stress and the immune system.

- **miR-107** and **miR-23b** are augmented in patients with **liver disease**. Both microRNAs would be good biomarkers since the area under the curve in both is greater than 0.8, and miR-23b reaches 100% of sensitivity and specificity.
- microRNAs may have utility in controlling the therapeutic effect of intravenous AAT, in treated patients, corroborating its effectiveness when, throughout the treatment, it reverted its expression to the levels of the control group

10. Bibliografía

References

1. Laurell C, Eriksson S. The Electrophoretic α 1-Globulin Pattern of Serum in α 1-Antitrypsin Deficiency. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1963;15:132-40.
2. Sharp HL, Bridges RA, Krivit W, Freier EF. Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: a previously unrecognized inherited disorder. *J Lab Clin Med*. 1969;73(6):934-9.
3. Janoff A, Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*. 1968;128(5):1137-55.
4. Turino GM, Seniorrm n, Garg BD, Keller S, Levi MM, Mandl I. Serum elastase inhibitor deficiency and alpha 1-antitrypsin deficiency in patients with obstructive emphysema. *Science*. 1969;165(3894):709-11.
5. Janoff A. Inhibition of human granulocyte elastase by serum alpha-1-antitrypsin. *Am Rev Respir Dis*. 1972;105(1):121-2.
6. Orphanet [Internet]. [cited 30 nov 2016]. Available from: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>.
7. FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras) [Internet].; 2016 [updated 30 nov;]. Available from: <http://www.enfermedades-raras.org/index.php/enfermedades-raras/enfermedades-raras-en-cifras>.
8. Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Lara B, Casas-Maldonado F, et al. Alpha-1 antitrypsin PiSZ genotype: estimated prevalence and number of SZ subjects worldwide. *International Journal of COPD*. 2017 Jun 1;12:1683-94.
9. Blanco I, Bueno P, Diego I, Pérez-Holanda S, Casas-Maldonado F, Esquinas C, et al. Alpha-1 antitrypsin PiZZ gene frequency and PiZZ genotype numbers worldwide: an update. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2017 Feb;12:561-9.

10. Dasí F, Escribano A. Capítulo 2: El déficit de alfa-1 antitripsina en el campo de las enfermedades raras. In: Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. Respira; 2016. p. 35-40.
11. REDAAT - Registro Español de Pacientes con Déficit Alfa-1 Antritripsina [Internet]. [cited Sep 16, 2017]. Available from: <http://www.redaat.es/boletines.php>.
12. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, et al. The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. J Biol Chem. 2001;276(36):33293-6.
13. Silverman GA, Whisstock JC, Bottomley SP, Huntington JA, Kaiserman D, Luke CJ, et al. Serpins Flex Their Muscle I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. J Biol Chem. 2010;285(32):24299-305.
14. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med. 1989;320(6):365-76.
15. Kalsheker N, Morley S, Morgan K. Gene regulation of the serine proteinase inhibitors alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin. Biochem Soc Trans. 2002;30(2):93-8.
16. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1-antitrypsin and its role in health and disease. Respir Med. 2011;105(8):1129-39.
17. Pérez-Holanda S, Blanco I, Menéndez M, Rodrigo L. Serum concentration of alpha-1 antitrypsin is significantly higher in colorectal cancer patients than in healthy controls. BMC Cancer. 2014;14:355-64.
18. Mornex JF, Chytil-Weir A, Martinet Y, Courtney M, LeCocq JP, Crystal RG. Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals. J Clin Invest. 1986;77(6):1952-61.
19. Geboes K, Ray MB, Rutgeerts P, Callea F, Desmet VJ, Vantrappen G. Morphological identification of alpha-1-antitrypsin in the human small intestine. Histopathology. 1982;6(1):55-60.

20. Bosco D, Meda P, Morel P, Matthey-Doret D, Caille D, Toso C, et al. Expression and secretion of alpha1-proteinase inhibitor are regulated by proinflammatory cytokines in human pancreatic islet cells. *Diabetologia*. 2005;48(8):1523-33.
21. Sefton L, Kelsey G, Kearney P, Povey S, Wolfe J. A physical map of the human PI and AACT genes. *Genomics*. 1990;7(3):382-8.
22. Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant. *Biochemistry*. 1984;23(21):4828-37.
23. Crystal RG. The alpha 1-antitrypsin gene and its deficiency states. *Trends Genet*. 1989;5(12):411-7.
24. Hafeez W, Ciliberto G, Perlmutter DH. Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types. *J Clin Invest*. 1992;89(4):1214-22.
25. Perlino E, Cortese R, Ciliberto G. The human alpha 1-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes. *EMBO J*. 1987;6(9):2767-71.
26. Janciauskiene S. Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1535(3):221-35.
27. Mast AE, Enghild JJ, Salvesen G. Conformation of the reactive site loop of alpha 1-proteinase inhibitor probed by limited proteolysis. *Biochemistry*. 1992;31(10):2720-8.
28. Knoell DL, Ralston DR, Coulter KR, Wewers MD. Alpha 1-antitrypsin and protease complexation is induced by lipopolysaccharide, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):246-55.
29. Rogers J, Kalsheker N, Wallis S, Speer A, Coutelle CH, Woods D, et al. The isolation of a clone for human alpha 1-antitrypsin and the detection of alpha 1-antitrypsin in mRNA from liver and leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;116(2):375-82.

30. Fregonese L, Stolk J. Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:16-25.
31. Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:655-709.
32. Gorrini M, Lupi A, Iadarola P, Dos Santos C, Rognoni P, Dalzoppo D, et al. SP-A binds alpha1-antitrypsin in vitro and reduces the association rate constant for neutrophil elastase. *Respir Res.* 2005;6:146-58.
33. Belaaouaj A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes Infect.* 2002;4(12):1259-64.
34. Janoff A, Sloan B, Weinbaum G, Damiano V, Sandhaus RA, Elias J, et al. Experimental emphysema induced with purified human neutrophil elastase: tissue localization of the instilled protease. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115(3):461-78.
35. Senior RM, Tegner H, Kuhn C, Ohlsson K, Starcher BC, Pierce JA. The induction of pulmonary emphysema with human leukocyte elastase. *Am Rev Respir Dis.* 1977;116(3):469-75.
36. Stoller JK, Aboussouan LS. A Review of α 1-Antitrypsin Deficiency. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(3):246-59.
37. Dickens JA, Lomas DA. Why has it been so difficult to prove the efficacy of alpha-1-antitrypsin replacement therapy? Insights from the study of disease pathogenesis. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:391-405.
38. Duranton J, Bieth JG. Inhibition of proteinase 3 by [alpha]1-antitrypsin in vitro predicts very fast inhibition in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(1):57-61.
39. Duranton J, Adam C, Bieth JG. Kinetic mechanism of the inhibition of cathepsin G by alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochemistry.* 1998;37(32):11239-45.
40. He S, Chen H, Zheng J. Inhibition of tryptase and chymase induced nucleated cell infiltration by proteinase inhibitors. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(12):1677-84.

41. Luo L, Jiang W. Inhibition profiles of human tissue kallikreins by serine protease inhibitors. *Biol Chem.* 2006;387(6):813-6.
42. Clemmensen I, Christensen F. Inhibition of urokinase by complex formation with human alpha1-antitrypsin. *Biochim Biophys Acta.* 1976;429(2):591-9.
43. Jedicke N, Struever N, Aggrawal N, Welte T, Manns MP, Malek NP, et al. α -1-antitrypsin inhibits acute liver failure in mice. *Hepatology.* 2014;59(6):2299-308.
44. Al-Omari M, Korenbaum E, Ballmaier M, Lehmann U, Jonigk D, Manstein DJ, et al. Acute-phase protein α 1-antitrypsin inhibits neutrophil calpain I and induces random migration. *Mol Med.* 2011;17(9-10):865-74.
45. Janciauskiene S, Nita I, Subramaniam D, Li Q, Lancaster JR, Matalon S. Alpha1-antitrypsin inhibits the activity of the matriptase catalytic domain in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(6):631-7.
46. Lazrak A, Nita I, Subramaniam D, Wei S, Song W, Ji H, et al. Alpha(1)-antitrypsin inhibits epithelial Na⁺ transport in vitro and in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41(3):261-70.
47. Brantly M. α 1-Antitrypsin: Not Just an Antiprotease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(6):652-4.
48. Spencer LT, Paone G, Krein PM, Rouhani FN, Rivera-Nieves J, Brantly ML. Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Mar;286(3):514-20.
49. Breit SN, Wakefield D, Robinson JP, Luckhurst E, Clark P, Penny R. The role of alpha 1-antitrypsin deficiency in the pathogenesis of immune disorders. *Clin Immunol Immunopathol.* 1985;35(3):363-80.
50. Nita IM, Serapinas D, Janciauskiene SM. alpha1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(6):1165-76.
51. Aldonyte R, Jansson L, Janciauskiene S. Concentration-dependent effects of native and polymerised alpha1-antitrypsin on primary human monocytes, in vitro. *BMC Cell Biol.* 2004;5:11-22.

52. Churg A, Dai J, Zay K, Karsan A, Hendricks R, Yee C, et al. Alpha-1-antitrypsin and a broad spectrum metalloprotease inhibitor, RS113456, have similar acute anti-inflammatory effects. *Lab Invest.* 2001;81(8):1119-31.
53. Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(3):592-600.
54. Zhang B, Lu Y, Campbell-Thompson M, Spencer T, Wasserfall C, Atkinson M, et al. Alpha1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. *Diabetes.* 2007;56(5):1316-23.
55. Petrache I, Fijalkowska I, Medler TR, Skirball J, Cruz P, Zhen L, et al. alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1155-66.
56. Toldo S, Seropian IM, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Salloum FN, Lewis EC, et al. Alpha-1 antitrypsin inhibits caspase-1 and protects from acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(2):244-51.
57. Dabbagh K, Laurent GJ, Shock A, Leoni P, Papakrivopoulou J, Chambers RC. Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways. *J Cell Physiol.* 2001;186(1):73-81.
58. Zhou X, Liu Z, Zhang J, Adelsberger JW, Yang J, Burton GF. Alpha-1-antitrypsin interacts with gp41 to block HIV-1 entry into CD4+ T lymphocytes. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):172-84.
59. Hadzic R, Nita I, Tassidis H, Riesbeck K, Wingren AG, Janciauskiene S. Alpha1-antitrypsin inhibits *Moraxella catarrhalis* MID protein-induced tonsillar B cell proliferation and IL-6 release. *Immunol Lett.* 2006;102(2):141-7.
60. Knappstein S, Ide T, Schmidt MA, Heusipp G. Alpha 1-antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun.* 2004;72(8):4344-50.

61. Nichols DP, Jiang D, Happoldt C, Berman R, Chu HW. Therapeutic Effects of α 1-Antitrypsin on *Pseudomonas aeruginosa* Infection in ENaC Transgenic Mice. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0141232.
62. Griesse M, Latzin P, Kappler M, Weckerle K, Heinzlmaier T, Bernhardt T, et al. α 1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. 2007;29(2):240-50.
63. Chan ED, Kaminska AM, Gill W, Chmura K, Feldman NE, Bai X, et al. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(8):690-6.
64. Lushbaugh WB, Kairalla AB, Hofbauer AF, Arnaud P, Cantey JR, Pittman FE. Inhibition of *Entamoeba histolytica* cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30(3):575-85.
65. Forney JR, Yang S, Healey MC. Antagonistic effect of human alpha-1-antitrypsin on excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol*. 1997;83(4):771-4.
66. Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev*. 1999;107(3):323-32.
67. Taggart C, Cervantes-Laurean D, Kim G, McElvaney NG, Wehr N, Moss J, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem*. 2000;275(35):27258-65.
68. Feng Y, Xu J, Zhou Q, Wang R, Liu N, Wu Y, et al. Alpha-1 Antitrypsin Prevents the Development of Preeclampsia Through Suppression of Oxidative Stress. *Front Physiol*. 2016;176(7):doi: 10.3389/fphys.2016.00176. eCollection 2016.
69. Janciauskiene S, Welte T. Well-Known and Less Well-Known Functions of Alpha-1 Antitrypsin. Its Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Other Disease Developments. *Ann Am Thorac Soc*. 2016;13(4):288.
70. dbSNP Short Genetic Variation [Internet]. [cited Oct 24, 2016]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?chooseRs=all&locusId=52

[65&mrna=NM_001127701.1&ctg=NT_026437.13&prot=NP_001121173.1&orient=reverse&refresh=refresh.](#)

71. Milger K, Holdt LM, Teupser D, Huber RM, Behr J, Kneidinger N. Identification of a novel SERPINA-1 mutation causing alpha-1 antitrypsin deficiency in a patient with severe bronchiectasis and pulmonary embolism. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:891-7.

72. Kueppers F, Black LF. α 1-Antitrypsin and Its Deficiency. *Am Rev Respir Dis*. 1974;110(2):176-94.

73. Fagerhol MK, Laurell C-. The polymorphism of "prealbumins" and α 1-antitrypsin in human sera. *Clinica Chimica Acta*. 1967;16(2):199-203.

74. Balduyck M, Odou M-, Zerimech F, Porchet N, Lafitte J-, Maitre B. Diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency: modalities, indications and diagnosis strategy. *Rev Mal Respir*. 2014;31(8):729-45.

75. Silva D, Oliveira MJ, Guimarães M, Lima R, Gomes S, Seixas S. Alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) mutation spectrum: Three novel variants and haplotype characterization of rare deficiency alleles identified in Portugal. *Respir Med*. 2016;116:8-18.

76. Lomas DA, Mahadeva R. α 1-Antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy. *J Clin Invest*. 2002;110(11):1585-90.

77. Mahadeva R, Chang WS, Dafforn TR, Oakley DJ, Foreman RC, Calvin J, et al. Heteropolymerization of S, I, and Z alpha1-antitrypsin and liver cirrhosis. *J Clin Invest*. 1999;103(7):999-1006.

78. Vidal R, Blanco I, Casas F, Jardí R, Miravittles M, Alfa-1-Antitripsina* DD, et al. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. *Arch Bronconeumol*. 2006;42(12):645-59.

79. Stockley RA, Luisetti M, Miravittles M, Piitulainen E, Fernandez P. Ongoing research in Europe: Alpha One International Registry (AIR) objectives and development. *Eur Respir J*. 2007;29(3):582-6.

80. Lara Gallego B, Abaitua Borda I, Galán Gil G, Castillo Villegas D, Casanova Espinosa Á, Cano Jiménez E, et al. Registros de enfermedades respiratorias integrados en el Registro Nacional de Enfermedades Raras. Archivos de Bronconeumología. 2014 September;50(9):397-403.
81. Ferrarotti I, Baccheschi J, Zorzetto M, Tinelli C, Corda L, Balbi B, et al. Prevalence and phenotype of subjects carrying rare variants in the Italian registry for alpha1-antitrypsin deficiency. J Med Genet. 2005;42(3):282-7.
82. Ferrarotti I, Gorrini M, Scabini R, Ottaviani S, Mazzola P, Campo I, et al. Secondary outputs of alpha1-antitrypsin deficiency targeted detection programme. Respir Med. 2008;102(3):354-8.
83. Zorzetto M, Russi E, Senn O, Imboden M, Ferrarotti I, Tinelli C, et al. SERPINA1 gene variants in individuals from the general population with reduced alpha1-antitrypsin concentrations. Clin Chem. 2008;54(8):1331-8.
84. Denden S, Zorzetto M, Amri F, Knani J, Ottaviani S, Scabini R, et al. Screening for Alpha 1 antitrypsin deficiency in Tunisian subjects with obstructive lung disease: a feasibility report. Orphanet J Rare Dis. 2009;4:12-7.
85. Bals R, Koczulla R, Kotke V, Andress J, Blackert K, Vogelmeier C. Identification of individuals with alpha-1-antitrypsin deficiency by a targeted screening program. Respir Med. 2007;101(8):1708-14.
86. Greulich T, Nell C, Herr C, Vogelmeier C, Kotke V, Wiedmann S, et al. Results from a large targeted screening program for alpha-1-antitrypsin deficiency: 2003 - 2015. Orphanet J Rare Dis. 2016;11:75-81.
87. Rodriguez-Frias F, Miravittles M, Vidal R, Camos S, Jordi R. Rare alpha-1-antitrypsin variants: are they really so rare? Ther Adv Respir Dis. 2012;6(2):79-85.
88. Buist AS, Burrows B, Cohen A, Crystal RG, Fallat RJ, Gadek JE, et al. Guidelines For The Approach To The Patient With Severe Hereditary Alpha-1-Antitrypsin Deficiency. Am Rev Respir Dis. 1989;140(5):1494-7.
89. Single Gene Disorders [Internet]. [cited Nov 19, 2016]. Available from: <http://learn.genetics.utah.edu/content/disorders/singlegene/>.

90. Solís-Herruzo JA, Solís Muñoz P. Prevención de déficit de alfa-1 antitripsina. GH Continuada. 2009;8(1):44-8.
91. Carroll TP, Greene CM, O'Connor CA, Nolan ÁM, O'Neill SJ, McElvaney NG. Evidence for Unfolded Protein Response Activation in Monocytes from Individuals with α -1 Antitrypsin Deficiency. The Journal of Immunology. 2010;184(8):4538-46.
92. Kelly E, Greene CM, Carroll TP, McElvaney NG, O'Neill SJ. Selenoprotein S/SEPS1 modifies endoplasmic reticulum stress in Z variant alpha1-antitrypsin deficiency. J Biol Chem. 2009;284(25):16891-7.
93. Hidvegi T, Schmidt BZ, Hale P, Perlmutter DH. Accumulation of mutant alpha1-antitrypsin Z in the endoplasmic reticulum activates caspases-4 and -12, NFkappaB, and BAP31 but not the unfolded protein response. J Biol Chem. 2005;280(47):39002-15.
94. Papp E, Száraz P, Korcsmáros T, Csermely P. Changes of endoplasmic reticulum chaperone complexes, redox state, and impaired protein disulfide reductase activity in misfolding α 1-antitrypsin transgenic mice. The FASEB Journal. 2006;20(7):1018-20.
95. Ordóñez A, Snapp EL, Tan L, Miranda E, Marciniak SJ, Lomas DA. Endoplasmic reticulum polymers impair luminal protein mobility and sensitize to cellular stress in alpha1-antitrypsin deficiency. Hepatology. 2013;57(5):2049-60.
96. Lawless MW, Greene CM, Mulgrew A, Taggart CC, O'Neill SJ, McElvaney NG. Activation of Endoplasmic Reticulum-Specific Stress Responses Associated with the Conformational Disease Z α 1-Antitrypsin Deficiency. The Journal of Immunology. 2004;172(9):5722-6.
97. Subramanian K, Meyer T. Calcium-Induced Restructuring of Nuclear Envelope and Endoplasmic Reticulum Calcium Stores. Cell. 1997;89(6):963-71.
98. Raeymaekers L, Larivière E. Vesicularization of the endoplasmic reticulum is a fast response to plasma membrane injury. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011;414(1):246-51.

99. Escribano A, Amor M, Pastor S, Castillo S, Sanz F, Codoñer-Franch P, et al. Decreased glutathione and low catalase activity contribute to oxidative stress in children with α -1 antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2015;70(1):82-3.
100. Sitia R, Molteni SN. Stress, protein (mis)folding, and signaling: the redox connection. *Sci STKE*. 2004;2004(239):pe27.
101. Nardai G, Stadler K, Papp E, Korcsmáros T, Jakus J, Csermely P. Diabetic changes in the redox status of the microsomal protein folding machinery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;334(3):787-95.
102. Turino GM. The Origins of a Concept: The Protease-Antiprotease Imbalance Hypothesis. *Chest*. 2002;122(3):1058-60.
103. Brebner JA, Stockley RA. Recent advances in α -1-antitrypsin deficiency-related lung disease. *Expert Rev Respir Med*. 2013;7(3):213-29.
104. Woolhouse I, Bayley D, Stockley R. Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of α 1-antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B4 and interleukin 8. *Thorax*. 2002;57(8):709-14.
105. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, Kobayashi DK, Kelley DG, Marconcini LA, et al. Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest*. 2006;116(3):753-9.
106. Mulgrew AT, Taggart CC, Lawless MW, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, et al. Z α 1-antitrypsin polymerizes in the lung and acts as a neutrophil chemoattractant. *Chest*. 2004;125(5):1952-7.
107. Mahadeva R, Atkinson C, Li Z, Stewart S, Janciauskiene S, Kelley DG, et al. Polymers of Z α 1-antitrypsin co-localize with neutrophils in emphysematous alveoli and are chemotactic in vivo. *Am J Pathol*. 2005;166(2):377-86.
108. Greene CM, Hassan T, Molloy K, McElvaney NG. The role of proteases, endoplasmic reticulum stress and SERPINA1 heterozygosity in lung disease and α -1 anti-trypsin deficiency. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2011;5(3):395-411.
109. Tan L, Dickens JA, Demeo DL, Miranda E, Perez J, Rashid ST, et al. Circulating polymers in α 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2014;43(5):1501-4.

110. de Serres F, Blanco I. Role of alpha-1 antitrypsin in human health and disease. *J Intern Med.* 2014;276(4):311-35.
111. Rodríguez E, Michel FJ, Curí S. Capítulo 8: Historia natural, diagnóstico clínico y seguimiento. In: Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. Respira; 2016. p. 169-89.
112. Garfia C, Martínez MT. Capítulo 9: Afectación hepática. In: Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. Respira; 2016. p. 191-212.
113. Laniado-Laborín R. Smoking and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Parallel epidemics of the 21 century. *International journal of environmental research and public health.* 2009 Jan;6(1):209.
114. Janus ED, Phillips NT, Carrell RW. Smoking, lung function, and alpha 1-antitrypsin deficiency. *Lancet.* 1985;1(8421):152-4.
115. Teckman JH. Liver Disease in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Current Understanding and Future Therapy. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* 2013;10(1):35-43.
116. Pan S, Huang L, McPherson J, Muzny D, Rouhani F, Brantly M, et al. SNP-mediated translational suppression of ERManI modifies the onset of end-stage liver disease in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology.* 2009;50(1):275-81.
117. Requena Fernández M. Conocimiento del déficit Alfa1-antitripsina y de la discinesia ciliar primaria por estudiantes de medicina y profesionales sanitarios [dissertation]. Universidad de Valencia; 2015.
118. Primhak RA, Tanner MS. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Arch Dis Child.* 2001;85(1):2-5.
119. Sveger T, Piitulainen E, Arborelius M. Clinical features and lung function in 18-year-old adolescents with alpha 1-antitrypsin deficiency. *Acta Paediatr.* 1995;84(7):815-6.
120. Sveger T. Prospective study of children with alpha 1-antitrypsin deficiency: eight-year-old follow-up. *J Pediatr.* 1984;104(1):91-4.

121. von Ehrenstein OS, Maier EM, Weiland SK, Carr D, Hirsch T, Nicolai T, et al. Alpha1 antitrypsin and the prevalence and severity of asthma. *Arch Dis Child*. 2004;89(3):230-1.
122. Talamo RC, Levison H, Lynch MJ, Hercz A, Hyslop NE, Bain HW. Symptomatic pulmonary emphysema in childhood associated with hereditary alpha-1-antitrypsin and elastase inhibitor deficiency. *J Pediatr*. 1971;79(1):20-6.
123. Glasgow JF, Lynch MJ, Hercz A, Levison H, Sass-Kortsak A. Alpha 1 antitrypsin deficiency in association with both cirrhosis and chronic obstructive lung disease in two sibs. *Am J Med*. 1973;54(2):181-94.
124. Houstek J, Copová M, Zapletal A, Tomášová H, Samánek M. Alpha 1 antitrypsin deficiency in a child with chronic lung disease. *Chest*. 1973;64(6):773-6.
125. Bustamante A, Lara B, Vidal R, Herrejón A, Blanco I, Hernández JM. Guía para pacientes con déficit de Alfa-1 antitripsina. 2014.
126. Bustamante A, Escribano A, Casas F. Capítulo 10: Manifestaciones Clínicas Respiratoria en niños y adultos. In: Déficit de alfa-1 antitripsina: fisiopatología, enfermedades relacionadas, diagnóstico y tratamiento. *Respira*; 2016. p. 213-29.
127. Tirado-Conde G, Lara B, Casas F, Blanco I, Bustamante A, Cadenas S, et al. Factors associated with the evolution of lung function in patients with alpha-1 antitrypsin deficiency in the Spanish registry. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(10):495-503.
128. Lara B, Blanco I, Martínez MT, Rodríguez E, Bustamante A, Casas F, et al. Spanish Registry of Patients With Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Database Evaluation and Population Analysis. *Arch Bronconeumol*. 2017;53(1):13-8.
129. Dowson LJ, Guest PJ, Stockley RA. The Relationship of Chronic Sputum Expectoration to Physiologic, Radiologic, and Health Status Characteristics in α 1-Antitrypsin Deficiency (PiZ). *Chest*. 2002;122(4):1247-55.
130. Demeo DL, Sandhaus RA, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. Determinants of airflow obstruction in severe alpha-1-antitrypsin deficiency. *Thorax*. 2007;62(9):806-13.

131. Novoradovsky A, Brantly ML, Wacławski MA, Chaudhary PP, Ihara H, Qi L, et al. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20(3):441-7.
132. Rodríguez F, de la Roza C, Jardi R, Schaper M, Vidal R, Miravittles M. Glutathione S-transferase P1 and lung function in patients with alpha1-antitrypsin deficiency and COPD. *Chest.* 2005;127(5):1537-43.
133. Demeo DL, Campbell EJ, Barker AF, Brantly ML, Eden E, McElvaney NG, et al. IL10 polymorphisms are associated with airflow obstruction in severe alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(1):114-20.
134. Wood AM, Simmonds MJ, Bayley DL, Newby PR, Gough SC, Stockley RA. The TNFalpha gene relates to clinical phenotype in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respir Res.* 2008;9:52-60.
135. Kim WJ, Wood AM, Barker AF, Brantly ML, Campbell EJ, Eden E, et al. Association of IREB2 and CHRNA3 polymorphisms with airflow obstruction in severe alpha-1 antitrypsin deficiency. *Respir Res.* 2012;13:16-23.
136. Hersh CP, Dahl M, Ly NP, Berkey CS, Nordestgaard BG, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease in alpha1-antitrypsin PI MZ heterozygotes: a meta-analysis. *Thorax.* 2004;59(10):843-9.
137. Sørheim I, Bakke P, Gulsvik A, Pillai SG, Johannessen A, Gaarder PI, et al. α_1 -Antitrypsin protease inhibitor MZ heterozygosity is associated with airflow obstruction in two large cohorts. *Chest.* 2010;138(5):1125-32.
138. Mohammad A, Segelmark M. Primary systemic vasculitis with severe α_1 -antitrypsin deficiency revisited. *Scandinavian Journal of Rheumatology.* 2014;43(3):242-5.
139. Blanco I, Lipsker D, Lara B, Janciauskiene S. Neutrophilic panniculitis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: an update. *Br J Dermatol.* 2016;174(4):753-62.
140. Gross B, Grebe M, Wencker M, Stoller JK, Bjursten LM, Janciauskiene S. New Findings in PiZZ alpha1-antitrypsin deficiency-related panniculitis. Demonstration of

skin polymers and high dosing requirements of intravenous augmentation therapy. *Dermatology (Basel)*. 2009;218(4):370-5.

141. Blanco I, Lara B, de Serres F. Efficacy of alpha1-antitrypsin augmentation therapy in conditions other than pulmonary emphysema. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:14-25.

142. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(7):818-900.

143. Tonelli AR, Brantly ML. Augmentation therapy in alpha-1 antitrypsin deficiency: advances and controversies. *Therapeutic Advances in Respiratory*. 2010;4(5):289-312.

144. Buffone GJ, Stennis BJ, Schimbor CM. Isoelectric focusing in agarose: classification of genetic variants of alpha 1-antitrypsin. *Clin Chem*. 1983;29(2):328-31.

145. Gadek JE, Klein HG, Holland PV, Crystal RG. Replacement therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency. Reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZ subjects. *J Clin Invest*. 1981;68(5):1158-65.

146. Teschler H. Long-term experience in the treatment of α 1-antitrypsin deficiency: 25 years of augmentation therapy. *Eur Respir Rev*. 2015;24(135):46-51.

147. Casas F, Blanco I, Martínez MT, Bustamante A, Miravittles M, Cadenas S, et al. Actualización sobre indicaciones de búsqueda activa de casos y tratamiento con alfa-1 antitripsina por vía intravenosa en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada a déficit de alfa-1 antitripsina. *Arch Bronconeumol*. 2015;51(4):185-92.

148. Campos MA, Kueppers F, Stocks JM, Strange C, Chen J, Griffin R, et al. Safety and pharmacokinetics of 120 mg/kg versus 60 mg/kg weekly intravenous infusions of alpha-1 proteinase inhibitor in alpha-1 antitrypsin deficiency: a multicenter, randomized, double-blind, crossover study (SPARK). *COPD*. 2013;10(6):687-95.

149. Rudnick DA, Shikapwashya O, Blumenkamp K, Teckman JH. Indomethacin increases liver damage in a murine model of liver injury from alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hepatology*. 2006;44(4):976-82.
150. Burrows JA, Willis LK, Perlmutter DH. Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1796-801.
151. Teckman JH. Lack of effect of oral 4-phenylbutyrate on serum alpha-1-antitrypsin in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency: a preliminary study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39(1):34-7.
152. Mahadeva R, Dafforn TR, Carrell RW, Lomas DA. 6-mer peptide selectively anneals to a pathogenic serpin conformation and blocks polymerization. Implications for the prevention of Z alpha(1)-antitrypsin-related cirrhosis. *J Biol Chem*. 2002;277(9):6771-4.
153. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
154. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
155. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.
156. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004;18(5):504-11.
157. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-73.
158. Curtis HJ, Sibley CR, Wood MJA. Mirtrons, an emerging class of atypical miRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(5):617-32.

159. Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10):E 1712.
160. Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. miRNA Nomenclature: A View Incorporating Genetic Origins, Biosynthetic Pathways, and Sequence Variants. *Trends Genet.* 2015;31(11):613-26.
161. Alipoor SD, Adcock IM, Garssen J, Mortaz E, Varahram M, Mirsaeidi M, et al. The roles of miRNAs as potential biomarkers in lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2016;791:395-404.
162. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003;115(2):209-16.
163. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
164. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* 2007;448(7149):83-6.
165. Berezikov E, Chung W, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell.* 2007;28(2):328-36.
166. Xie M, Steitz JA. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. *RNA Biol.* 2014;11(6):673-81.
167. Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):4626-40.
168. Ender C, Krek A, Friedländer MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, et al. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Mol Cell.* 2008;32(4):519-28.
169. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):209-20.
170. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H, Miyoshi K, Miyoshi T. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics.* 2010;284(2):95-103.

171. Okamura K, Lai EC. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(9):673-8.
172. Lund E, Dahlberg JE. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science.* 1998;282(5396):2082-5.
173. Yang J, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15163-8.
174. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92-105.
175. Elton TS, Martin MM, Sansom SE, Belevych AE, Györke S, Terentyev D. miRNAs got rhythm. *Life Sci.* 2011;88(9-10):373-83.
176. Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucl Acids Res.* 2011;39(16):6845-53.
177. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res.* 2009;19(7):1175-83.
178. Schnall-Levin M, Rissland OS, Johnston WK, Perrimon N, Bartel DP, Berger B. Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs. *Genome Res.* 2011;21(9):1395-403.
179. Kim DH, Saetrom P, Snøve O, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(42):16230-5.
180. Seok H, Ham J, Jang E, Chi aSW. MicroRNA Target Recognition: Insights from Transcriptome-Wide Non-Canonical Interactions. *Molecules and Cells.* 2016;39(5):375-81.
181. Jin HY, Xiao C. MicroRNA Mechanisms of Action: What have We Learned from Mice? *Front Genet.* 2015;6:328.
182. miRbase:Sequences [Internet]. [cited Nov 19, 2016]. Available from: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>.

183. Machado MT, Navega S, Dias F, de Sousa, Maria José Carneiro, Teixeira AL, Medeiros R. microRNAs for peripheral blood fraction identification: Origin, pathways and forensic relevance. *Life Sci.* 2015;143:98-104.
184. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(11):460-5.
185. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7223-33.
186. Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, et al. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *PNAS.* 2013;110(11):4255-60.
187. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, Vlasakova K, Muniappa N, Tanaka WK, et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem.* 2009;55(11):1977-83.
188. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy.* 2009;9(6):703-11.
189. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* 2016;51(3):33-49.
190. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56(11):1733-41.
191. Miyaaki H, Ichikawa T, Kamo Y, Taura N, Honda T, Shibata H, et al. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2014;34(7):302-7.
192. Pirola CJ, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Mallardi P, San Martino J, Mora Gonzalez Lopez Ledesma, María, et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015;64(5):800-12.

193. Becker PP, Rau M, Schmitt J, Malsch C, Hammer C, Bantel H, et al. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0142661.
194. Tan Y, Pan T, Ye Y, Ge G, Chen L, Wen D, et al. Serum microRNAs as potential biomarkers of primary biliary cirrhosis. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e111424.
195. Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, et al. Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e66086.
196. Yan IK, Wang X, Asmann YW, Haga H, Patel T. Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0155888.
197. Akbas F, Coskunpinar E, Aynaci E, Oltulu YM, Yildiz P. Analysis of serum micro-RNAs as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res*. 2012;38(6):286-94.
198. Sanfiorenzo C, Ilie MI, Belaid A, Barlési F, Mouroux J, Marquette C, et al. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54596.
199. Wang M, Huang Y, Liang Z, Liu D, Lu Y, Dai Y, et al. Plasma miRNAs might be promising biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Respir J*. 2016;10(1):104-11.
200. Elbehidy RM, Youssef DM, El-Shal AS, Shalaby SM, Sherbiny HS, Sherief LM, et al. MicroRNA-21 as a novel biomarker in diagnosis and response to therapy in asthmatic children. *Mol Immunol*. 2016;71:107-14.
201. Sawant DV, Yao W, Wright Z, Sawyers C, Tepper RS, Gupta SK, et al. Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Allergic Inflammatory Disease in Children. *Microna*. 2015;4(1):36-40.
202. Pattarayan D, Thimmulappa RK, Ravikumar V, Rajasekaran S. Diagnostic Potential of Extracellular MicroRNA in Respiratory Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016:epub ahead of print.

203. Li P, Li J, Chen T, Wang H, Chu H, Chang J, et al. Expression analysis of serum microRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Mol Med*. 2014;33(6):1554-62.
204. Li P, Zhao G, Chen T, Chang J, Wang H, Chen S, et al. Serum miR-21 and miR-155 expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Asthma*. 2013;50(9):960-4.
205. Yang G, Yang L, Wang W, Wang J, Wang J, Xu Z. Discovery and validation of extracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Gene*. 2015;562(1):138-44.
206. Xie L, Wu M, Lin H, Liu C, Yang H, Zhan J, et al. An increased ratio of serum miR-21 to miR-181a levels is associated with the early pathogenic process of chronic obstructive pulmonary disease in asymptomatic heavy smokers. *Mol Biosyst*. 2014;10(5):1072-81.
207. Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart Fail*. 2013;15(10):1138-47.
208. Liu F, Qin H, Xu B, Zhou H, Zhao D. Profiling of miRNAs in pediatric asthma: upregulation of miRNA-221 and miRNA-485-3p. *Mol Med Rep*. 2012;6(5):1178-82.
209. Panganiban RPL, Pinkerton MH, Maru SY, Jefferson SJ, Roff AN, Ishmael FT. Differential microRNA expression in asthma and the role of miR-1248 in regulation of IL-5. *Am J Clin Exp Immunol*. 2012;1(2):154-65.
210. Levänen B, Bhakta NR, Torregrosa Paredes P, Barbeau R, Hiltbrunner S, Pollack JL, et al. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):894-903.
211. Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1423-32.
212. Leidinger P, Keller A, Borries A, Huwer H, Rohling M, Huebers J, et al. Specific peripheral miRNA profiles for distinguishing lung cancer from COPD. *Lung Cancer*. 2011;74(1):41-7.

213. Yang K, Gao B, Wei W, Li Z, Pan L, Zhang J, et al. Changed profile of microRNAs in acute lung injury induced by cardio-pulmonary bypass and its mechanism involved with SIRT1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1104-15.
214. Molina-Pinelo S, Pastor MD, Suarez R, Romero-Romero B, González De la Peña, Miriam, Salinas A, et al. MicroRNA clusters: dysregulation in lung adenocarcinoma and COPD. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1740-9.
215. Pottelberge, Mestdagh, Bracke, Thas, Durme, Joos, et al. MicroRNA Expression in Induced Sputum of Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011 04;183(7):898-906.
216. Ambion, (Life Technologies). mirVana™ miRNA Isolation Kit protocol. 2011.
217. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotech*. 1996;14(13):1675-80.
218. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-64.
219. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.
220. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:6115.1027.
221. Benjamini Y, Hochberg Y. controlling the false Discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 1995;57:289-300.
222. Sartor MA, Leikauf GD, Medvedovic M. LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;25(2):211-7.

223. Garcia-Garcia F, Panadero J, Dopazo J, Montaner D. Integrated gene set analysis for microRNA studies. *Bioinformatics*. 2016;32(18):2809-16.
224. Montaner D, Dopazo J. Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10348.
225. Alonso R, Salavert F, Garcia-Garcia F, Carbonell-Caballero J, Bleda M, Garcia-Alonso L, et al. Babelomics 5.0: functional interpretation for new generations of genomic data. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):117-21.
226. miRWalk2.0 [Internet]. []. Available from: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>.
227. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Meth*. 2015;12(8):697-.
228. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl Acids Res*. 2014;42(Database issue):68-73.
229. Griffiths-Jones. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 2006 01;34(Database issue):140-4.
230. Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*. 2004;20(4):578-80.
231. Babelomics 5 [Internet]. []. Available from: <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>.
232. Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem*. 2012;431(1):69-75.
233. Applied biosystem. TaqMan® Advanced miRNA Assays USER GUIDE. 2016.
234. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

235. análisis bioinformático de los arrays [Internet]. []. Available from: http://bioinfo.cipf.es/consulting2010/francisco_dasi/start.
236. Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams [Internet].; 2015 [updated 2007-;]. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
237. Zhang H, Forman HJ, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Meth Enzymol*. 2005;401:468-83.
238. Rathbun WB. Lenticular glutathione synthesis: rate-limiting factors in its regulation and decline. *Curr Eye Res*. 1984;3(1):101-8.
239. Sierzega M, Kaczor M, Kolodziejczyk P, Kulig J, Sanak M, Richter P. Evaluation of serum microRNA biomarkers for gastric cancer based on blood and tissue pools profiling: the importance of miR-21 and miR-331. *Br J Cancer*. 2017;117(2):266-73.
240. Hassan T, Carroll TP, Buckley PG, Cummins R, O'Neill SJ, McElvaney NG, et al. MiR-199a-5p silencing regulates the unfolded protein response in chronic obstructive pulmonary disease and α 1-antitrypsin deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014;189(3):263-73.
241. Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol*. 2004;1(2):106-13.
242. Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, Dong Q, et al. Identification of miRNomes in Human Liver and Hepatocellular Carcinoma Reveals miR-199a/b-3p as Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*. 2011;19(2):232-43.
243. Hsu S, Ghoshal K. MicroRNAs in Liver Health and Disease. *Curr Pathobiol Rep*. 2013 Mar;1(1):53-62.
244. Waidmann O, Köberle V, Brunner F, Zeuzem S, Piiper A, Kronenberger B. Serum microRNA-122 predicts survival in patients with liver cirrhosis. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e45652.

245. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*. 2006;3(2):87-98.
246. Hsu S, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2871-83.
247. Tsai W, Hsu S, Hsu C, Lai T, Chen S, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2884-97.
248. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003;144(12):5179-83.
249. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Yamagami M, Yoshikawa T, Kishikawa T, et al. MicroRNAs and liver disease. *J Hum Genet*. 2017;62(1):75-80.
250. Zheng N, Zhou Q, Wang Z, Wei W. Recent advances in SCF ubiquitin ligase complex: Clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2016;1866(1):12-22.
251. Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2011;6:413-21.
252. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J*. 2006;28(1):219-42.
253. Bernardo I, Bozinovski S, Vlahos R. Targeting oxidant-dependent mechanisms for the treatment of COPD and its comorbidities. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;155:60-79.
254. Gupta I, Ganguly S, Rozanas CR, Stuehr DJ, Panda K. Ascorbate attenuates pulmonary emphysema by inhibiting tobacco smoke and Rtp801-triggered lung protein modification and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(29):4208.

255. Escribano A, Pastor S, Reula A, Castillo S, Vicente S, Sanz F, et al. Accelerated telomere attrition in children and teenagers with α 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J*. 2016;48(2):350-8.
256. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(8):2697-706.
257. Khuu C, Utheim TP, Sehic A. The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. *Scientifica (Cairo)*. 2016;2016:10 pages.
258. Singh B, Ronghe AM, Chatterjee A, Bhat NK, Bhat HK. MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2013;34(5):1165-72.
259. Fabbri E, Borgatti M, Montagner G, Bianchi N, Finotti A, Lampronti I, et al. Expression of microRNA-93 and Interleukin-8 during *Pseudomonas aeruginosa*-mediated induction of proinflammatory responses. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(6):1144-55.
260. Oglesby IK, Vencken SF, Agrawal R, Gaughan K, Molloy K, Higgins G, et al. miR-17 overexpression in cystic fibrosis airway epithelial cells decreases interleukin-8 production. *Eur Respir J*. 2015;46(5):1350-60.
261. Hong Z, Hong H, Liu J, Zheng X, Huang M, Li C, et al. miR-106a Is Downregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronic Hepatitis B and Associated with Enhanced Levels of Interleukin-8. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:9 pages.
262. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(4):566-77.
263. Manne RK, Agrawal Y, Bargale A, Patel A, Paul D, Gupta NA, et al. A MicroRNA/Ubiquitin Ligase Feedback Loop Regulates Slug-Mediated Invasion in Breast Cancer. *Neoplasia*. 2017 Jun;19(6):483-95.

264. Xinchao Zhang, Ye Kong, Xia Xu, Huaixin Xing, Yingjie Zhang, Fengjuan Han, et al. F-box protein FBXO31 is down-regulated in gastric cancer and negatively regulated by miR-17 and miR-20a. *Oncotarget*. 2014;5(15):6178-90.
265. Miao N, Wang X, Hou Y, Feng Y, Gong Y. Identification of male-biased microRNA-107 as a direct regulator for nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 based on sexually dimorphic microRNA expression profiling from chicken embryonic gonads. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;429:29-40.
266. Gracia A, Fernández-Quintela A, Miranda J, Eseberri I, González M, Portillo MP. Are miRNA-103, miRNA-107 and miRNA-122 Involved in the Prevention of Liver Steatosis Induced by Resveratrol? *Nutrients*. 2017;9(4):pii: E360. doi: 10.3390/nu9040360.
267. Bhatia H, Verma G, Datta M. miR-107 orchestrates ER stress induction and lipid accumulation by post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(4):334-43.
268. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(24):11693-7.
269. Motiño O, Francés DE, Mayoral R, Castro-Sánchez L, Fernández-Velasco M, Boscá L, et al. Regulation of MicroRNA 183 by Cyclooxygenase 2 in Liver Is DEAD-Box Helicase p68 (DDX5) Dependent: Role in Insulin Signaling. *Mol Cell Biol*. 2015;35(14):2554-67.

11. Trabajos derivados

11.1. Comunicaciones científicas

- ⇒ DASÍ F, PASTOR S, MATA M, AMOR M, SERNA E, CASTILLO S, SANZ F, CODOÑER-FRANCH P, ESCRIBANO A. Circulating microRNAs as a potential biomarkers in alpha-1 antitrypsin deficiency patients. ERS Annual Congress. München, Alemania. 6-10 septiembre, 2014. *Publicado en Eur Respir J* 2014; 44: Suppl. 58, 852078
- ⇒ PASTOR S, MARTÍNEZ M, ESCRIBANO A, REULA A, VICENTE S, GÓMEZ J, SORIA E, DASÍ F. Circulating microRNAs as a potential biomarkers in alpha-1 antitrypsin deficiency patients. I Congreso Internacional de Enfermedades Raras Respiratorias. Valencia, España. 17-18 febrero, 2016.

11.2. Proyectos de Investigación financiados

- ⇒ FIS. Título: “Estudio de la utilidad clínica del perfil de estrés oxidativo y de la expresión de microRNAs, en sangre y en condensado de aire exhalado en pacientes con déficit de alpha-1 antitripsina”. Investigador principal: Dr. Francisco Dasí Fernández . Nº de expediente PI11/02884. Años:2011-2014
- ⇒ AYUDA A LA INVESTIGACIÓN EN PEDIATRÍA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PEDIATRÍA (AEP). Título: “Estudio del perfil de micro-RNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas”. Investigadora Principal: Dra. Amparo Escribano

Montaner. Fundación Hospital Clínico Universitario/IIS INCLIVA, Valencia.
Equipo investigador: Pilar Codoñer-Franch, Francisco Sanz, Silvia Castillo,
Mónica Amor, Sara Pastor, Francisco Dasí.

- ⇒ FIS. Título: “Análisis de los parámetros de estrés oxidativo, función mitocondrial, longitud de telómeros y perfil de miRNA circulante en pacientes con DAAT. Implicaciones pronósticas”. Investigador principal: Dr. Francisco Dasí Fernández . Nº de expediente PI14/02162. Años:2014-2017
- ⇒ PROGRAMA VLC-BIOCLINIC. SUBPROGRAMA B: ACCIONS PREPARATORIES 2015. Universitat de Valencia-INCLIVA: “Análisis de los perfiles de expresión de microRNAs utilizando mapas auto-organizativos para el diagnóstico y pronóstico de individuos con déficit de alfa-1 antitripsina” Co-IPs: Francisco Dasí Fernández y Marcelino Martínez Soler.
- ⇒ PROGRAMA VLC-BIOCLINIC. SUBPROGRAMA B: ACCIONS PREPARATORIES 2016. Universitat de Valencia-INCLIVA: “Análisis de los perfiles de expresión de microRNAs utilizando mapas auto-organizativos para el pronóstico de individuos con déficit de alfa-1 antitripsina” Co-IPs: Francisco Dasí Fernández y Marcelino Martínez Soler.

12. Anexos

12.1. Anexo 1



INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CLINICA DEL HOSPITAL CLINIC UNIVERSITARI DE VALENCIA

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de ordinaria de fecha 23 de febrero de 2012, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Estudio de la utilidad clínica del perfil de estrés oxidativo y de la expresión de miRNAs, en sangre y en condensado de aire exhalado, en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina

Que será llevado a cabo en los laboratorios de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínic Universitario de Valencia y cuyo investigador principal es el Dr. Francisco Dasi Fernández, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la ***Declaración de Helsinki*** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la ***Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO*** y los acuerdos del ***Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina*** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la Convocatoria de Ayudas Proyectos de Investigación en Salud.

Valencia, 23 de febrero de 2012.

Fdo. : Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

**DON MIGUEL ÁNGEL CALLEJA HERNÁNDEZ, EN
CALIDAD DE SECRETARIO DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN DE LA PROVINCIA DE GRANADA,**

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado favorablemente, en su reunión celebrada el día 29 de junio de 2015, el proyecto, presentado por el Dr. Francisco Casas Maldonado F.E.A. de la U.G.C. de Neumología del Complejo Hospitalario Universitario Granada, titulado: **"Análisis de parámetros de estrés oxidativo, función mitocondrial, longitud de telómeros y perfil de miRNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones pronósticas"**. **INVESTIGADOR PRINCIPAL: Francisco Dasi Fernandez. Dr. Casas CHUG (SC). Aprobado por el CEI Hospital de Pontevedra-Vigo-Orense.**

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el mencionado estudio.

Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.

Y que este Comité acepta que dicho proyecto sea realizado en el **Complejo Hospitalario Universitario de Granada (SC).**

Lo que firmo en Granada, a dos de julio de dos mil quince.

HOSPITAL UNIVERSITARIO "San Cecilio"
Ave. Dr. Olóz, 16. 18012 - GRANADA
Tfno: 958 02 30 00



Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 946425; ceic@sergas.es



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE PONTEVEDRA-VIGO-ORENSE

María Asunción Verdejo González, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Pontevedra-Vigo-Ourense

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 24/02/2015 el estudio:

Título: Análisis de parámetros de estrés oxidativo, función mitocondrial, longitud de telómeros y perfil de miRNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones pronósticas

Promotor: Dr. Francisco Dasí Fernández

Código de Registro: 2014/673

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

| Centros | Investigadores Principales |
|-----------|----------------------------|
| EOXI Vigo | María Luisa Torres Durán |

* Vinculado al compromiso de obtener para cualquier menor de edad, el consentimiento informado firmado por ambos progenitores/tutores legales o en el caso de que autorice uno solo de ellos, éste ha de afirmar que conoce la ausencia de oposición del otro progenitor /tutor (además de obtener el asentimiento de los niños de 12 o más años de edad, como ustedes bien señalan).

En Vigo, a 06 de marzo de 2015

La secretaria



12.2. Anexo 2

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “**Análisis de parámetros de estrés oxidativo, función mitocondrial, longitud de telómeros y perfil de miRNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones pronósticas**” que está siendo realizado por el **Dr. Francisco Dasí Fernández** del **Servicio de Investigación** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes:

El déficit de alfa-1 antitripsina es una enfermedad genética y hereditaria en la que los pacientes tienen niveles sanguíneos bajos de una proteína, la alfa-1 antitripsina. Los pacientes que tienen déficit de alfa-1 antitripsina tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades pulmonares y hepáticas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el estrés oxidativo está aumentado en los pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina y es un factor que contribuye al daño en los pulmones y en el hígado observado en algunos pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

En este estudio lo que queremos es identificar cómo se produce el estrés oxidativo en los pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina y valorar si el estudio del estrés oxidativo le sirve al médico como factor pronóstico de la enfermedad, es decir para saber cómo va a evolucionar un paciente con el déficit.

¿Por qué se le ha pedido que participe?

Se le pide su participación en este estudio ya que ha sido diagnosticado de **Déficit de alfa-1 antitripsina**.

¿En qué consiste su participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se le realizarán?

Se le solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre que le será extraída cuando venga al Hospital para que se le realice el control periódico de su patología**.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que esté llevando (si lo tiene) y todo tratamiento que se le pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se le realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se prevé ningún riesgo adicional para usted ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte de las muestras de sangre que le fueron extraídas durante el control periódico de su enfermedad.

El riesgo previsible de su participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para usted, pero podrá ayudar a conocer mejor su enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de su enfermedad realicen ni su

médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de su enfermedad. Así mismo, podrá retirarse del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comente con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para su participación. Así mismo, podrá solicitar cualquier explicación que desee sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, el **Dra. Amparo Escribano Montaner** en los teléfonos **96/ 197 3882 ó 96/ 197 3877**.

Confidencialidad:

Todos sus datos, así como toda la información médica relacionada con su enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrá ejercer su derecho a acceder, rectificar o cancelar sus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante su participación en este estudio, se le extraerá una **muestra de sangre periférica**. Una parte de la muestra será utilizada en el presente proyecto de investigación, y en el caso de que no la utilizáramos totalmente, el excedente será almacenado en una colección registrada y autorizada por el Instituto de Salud Carlos III. Dicha colección se encuentra en los laboratorios de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario, en un congelador a una temperatura de 80 grados bajo cero (-80 °C) ubicado en el piso 2E (laboratorio 16) de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si usted así lo autoriza en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de su enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE MAYOR DE 12 AÑOS Y MENOR DE 18 AÑOS DE EDAD

Se te ofrece la posibilidad de participar en el proyecto de investigación titulado “**Análisis de parámetros de estrés oxidativo, función mitocondrial, longitud de telómeros y perfil de miRNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones pronósticas**” que está siendo realizado por el **Dr. Francisco Dasí Fernández** del **Servicio de Investigación** y que ha sido ya evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Antecedentes:

El déficit de alfa-1 antitripsina es una enfermedad genética y hereditaria en la que los pacientes tienen niveles sanguíneos bajos de una proteína, la alfa-1 antitripsina. Los pacientes que tienen déficit de alfa-1 antitripsina tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades pulmonares y hepáticas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el estrés oxidativo está aumentado en los pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina y es un factor que contribuye al daño en los pulmones y en el hígado observado en algunos pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

En este estudio lo que queremos es identificar cómo se produce el estrés oxidativo en los pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina y valorar si el estudio del estrés oxidativo le sirve al médico como factor pronóstico de la enfermedad, es decir para saber cómo va a evolucionar un paciente que tiene déficit de alfa-1 antitripsina.

¿Por qué se te ha pedido que participe?

Se te pide tu participación en este estudio ya que te han diagnosticado **Déficit de alfa-1 antitripsina**.

¿En qué consiste tu participación? ¿Qué tipo de pruebas o procedimientos se te realizarán?

Se te solicita permiso para utilizar con fines científicos **una muestra de sangre que te será extraída cuando vengas al Hospital para que se le realice el control periódico de tu enfermedad**.

La participación en el presente proyecto no supone ninguna alteración del tratamiento que estés llevando (en el caso de que llevas) y todo tratamiento que se te pueda poner a partir de los estudios clínico-bioquímicos que se te realicen será siempre bajo criterio médico.

¿Cuáles son los riesgos generales de participar en este estudio?

No se prevé ningún riesgo adicional para ti, ya que utilizaremos para el estudio una pequeña parte de las muestras de sangre que te fueron extraídas durante el control periódico de tu enfermedad.

El riesgo previsible de tu participación únicamente será el mínimo riesgo que conlleva la extracción de una muestra de sangre, que incluye molestias, dolor, enrojecimiento e hinchazón y/o pequeños hematomas en el lugar del brazo donde se ha producido la extracción.

¿Cuáles son los beneficios de la participación en este estudio?

Es muy posible que los resultados obtenidos en esta investigación tengan poco valor diagnóstico o predictivo para ti, pero podrá ayudar a conocer mejor tu enfermedad y mejorar el pronóstico y el tratamiento de futuros pacientes.

¿Qué pasará si decido no participar en este estudio?

Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria. En caso de que decida no participar en el estudio, esto no modificará el trato y seguimiento que de tu enfermedad realicen ni tu médico ni el resto del personal sanitario que se ocupa de tu enfermedad. Así mismo, podrás retirarte del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones.

¿A quién puedo preguntar en caso de duda?

Es importante que comentes con cualquiera de los investigadores de este proyecto los pormenores o dudas que surjan antes de firmar el consentimiento para tu participación. Así mismo, podrás solicitar cualquier explicación que desees sobre cualquier aspecto del estudio y sus implicaciones a lo largo del mismo contactando con el investigador principal del proyecto, la **Dra. Amparo Escribano Montaner** en los teléfonos **96/ 197 3882 ó 96/ 197 3877**.

Confidencialidad:

Todos tus datos, así como toda la información médica relacionada con tu enfermedad será tratada con absoluta confidencialidad por parte del personal encargado de la investigación. Así mismo, si los resultados del estudio fueran susceptibles de publicación en revistas científicas, en ningún momento se proporcionarán datos personales de los pacientes que han colaborado en esta investigación.

Tal y como contempla la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal, podrás ejercer tu derecho a acceder, rectificar o cancelar tus datos contactando con el investigador principal de este estudio.

¿Qué pasará con las muestras biológicas obtenidas durante la investigación?

Durante tu participación en este estudio, se te extraerá una **muestra de sangre periférica**. Una parte de la muestra será utilizada en el presente proyecto de investigación, y en el caso de que no la utilizáramos totalmente, el excedente será almacenado en una colección registrada y autorizada por el Instituto de Salud Carlos III. Dicha colección se encuentra en los laboratorios de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico Universitario, en un congelador a una temperatura de 80 grados bajo cero (-80 °C) ubicado en el piso 2E (laboratorio 16) de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universitat de València.

Esta muestra será siempre utilizada con fines científicos, pudiéndose utilizar si así lo autorizas en el marco de otros proyectos de investigación que tengan como objetivo el estudio de tu enfermedad y que previamente hayan sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital.

Además, este material no será bajo ningún concepto ni en ningún momento motivo de lucro, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto: "Análisis de parámetros de estrés oxidativo, función mitocondrial, longitud de telómeros y perfil de miRNAs circulantes en pacientes con déficit de alfa-1 antitripsina. Implicaciones pronósticas"

Investigador principal: Dr. Francisco Dasí Fernández

Servicio: Investigación/Pediatría

Yo, _____ he sido informado por la Dra.

Amparo Escribano Montaner, colaborador del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la Hoja de Información que se me ha entregado
- He podido hacer preguntas sobre el estudio
- He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- He recibido suficiente información sobre el estudio
- Comprendo que mi participación es voluntaria
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera

- Sin tener que dar explicaciones

- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Autorizo a que las muestras obtenidas durante el proyecto de investigación sean utilizadas con fines científicos en otros proyectos de investigación que tengan por objeto el estudio de mi enfermedad y que hayan sido aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia

Sí No

Quiero que se me pida autorización previa para utilizar mis muestras biológicas para futuros proyectos de investigación

Sí No

Con esto doy mi conformidad para participar en este estudio,

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del Investigador:

Fecha

12.3. Anexo 3

| | | |
|------------------------------------|----|----|
| Nombre Paciente | | |
| Fecha de nacimiento | | |
| Edad en el momento del diagnóstico | | |
| Edad actual (años) | | |
| Sexo | | |
| Peso Kg (p) | | |
| Talla cm (p) | | |
| Afectación hepática | NO | SI |
| -Hepatitis | | |
| -Enfermedad hepática | | |
| Antecedentes respiratorios | NO | SI |
| - HRB | | |
| -Asma | | |
| -Alergia | | |
| -Rinitis alérgica | | |
| -Neumonías | | |
| -Atelectasias | | |
| Otras | | |

| | | |
|----------------------------|--------------|-------------|
| Intervenciones quirúrgicas | NO | SI.Cuál? |
| Estado actual | Asintomático | Sintomático |
| | | |
| Otros: | | |
| Tratamientos recibidos | NO/SI | |
| Corticoides | | Tipo |
| Dosis/día | | |
| Desde cuándo | | |
| Ciclos/año | | |
| Tratamiento actual | | |
| Dosis/día | | |
| Desde cuándo | | |

12.3.1. Anexo 3b : Pruebas para conocer el estado del paciente

| Prueba | Fecha | Valor | |
|---------------|-------|-------|--|
| Espirometría | | | |
| FVC% | | | |
| FEV1 | | | |
| FEV1/FVC (%) | | | |
| MEEF25-75 | | | |
| Transaminasas | | | |
| GOT | | | |
| ALT | | | |
| GGT | | | |

12.4. Anexo 4

Tabla S 1. Funciones inhibidas por el miR-122.

| Función general | Función específica | % inhibición | genes inhibidos |
|----------------------------|---|--------------|------------------------------|
| Regulación de iones | Transporte transmembrana de ión de cobre(GO:0035434) | 50,00 | CREB1, CALR, HMOX1, SLC11A2, |
| | Importe del ión de cobre(GO:0015677) | 33,33 | FSTL3, CLIC4, KRT10, KRT14, |
| | Homeostasis del ión de cobre (GO:0055070) | 12,50 | SLC3A1, CCS, ATP7A, XIAP, |
| | Homeostasis celular del ión de cobre(GO:0006878) | 11,11 | ANXA7, ANXA11, CDK4, KRT14, |
| | Transporte del ión cobre (GO:0006825) | 10,81 | SLC31A1, OLA1, GNL3L. |
| | Transporte del ión ferroso (GO:0015684) | 10,00 | |
| | Respuesta al ión hierro(GO:0010039) | 6,82 | |
| | Respuesta celular a los iones metálicos (GO:0071248) | 3,38 | |
| | Respuesta a los iones metálicos (GO:0010038) | 2,53 | |
| | Transporte de iones de metales de transición (GO:0000041) | 1,96 | |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|----------------------------------|
| Metabolismo de glúcidos | Transporte de glucose-6-phosphate (GO:0015760) | 33,33 | PFKFB2, PHPT1, TGFB1, GLUL, SRF, |
| | Respuesta celular al estímulo de glucosa (GO:0071333) | 4,42 | AACS, BIRC5, ACVR1C, CYP7A1, |
| | Respuesta a glucosa (GO:0009749) | 4,52 | PHKA1, BPGM, GK5, PKM, G6PC, |
| | Homeostasis de glucosa celular (GO:0001678) | 3,65 | FUT8, ALDOA |
| | Homeostasis de glucosa (GO:0042593) | 2,05 | |
| | Transporte de hexosa fosfato (GO:0015712) | 33,33 | |
| | Respuesta a hexosa (GO:0009746) | 4,29 | |
| | Respuesta celular al estímulo de hexosa (GO:0071331) | 4,17 | |
| | Respuesta a monosacárido (GO:0034284) | 4,19 | |
| | Respuesta celular al estímulo de monosacárido (GO:0071326) | 4,13 | |
| | Proceso metabólico de polisacáridos (GO:0005976) | 1,82 | |
| | Respuesta a los carbohidratos (GO:0009743) | 3,63 | |
| | Respuesta celular al estímulo de carbohidratos (GO:0071322) | 3,55 | |

| | | | |
|-----------------------------|---|--------------|---|
| | Proceso catabólico de carbohidratos de un solo organismo (GO:0044724) | 2,06 | |
| | Homeostasis de carbohidratos (GO:0033500) | 2,05 | |
| | Proceso catabólico de carbohidratos (GO:0016052) | 1,95 | |
| Metabolismo lipídico | Proceso biosintético de esfingolípidos(GO:0046520) | 30,00 | TGFB1, AACS, CYP7A1, ANG, |
| | Proceso metabólico de esfingolípidos(GO:0046519) | 14,29 | MOGAT1, SPTLC1, SPTLC3, ACER2 |
| | Proceso biosintético de diacilglicerol (GO:0006651) | 28,57 | |
| | Respuesta al colesterol (GO:0070723) | 7,14 | |
| Estrés oxidativo | Respuesta celular al estrés oxidativo (GO:0034599) | 2,15 | OLR1, MPV17, PRKRA, AXL, |
| | Regulación positiva del proceso metabólico de las especies reactivas del oxígeno (GO:2000379) | 4,30 | ROMO1, HMOX1, CCS, SLC11A2, FANCC, ATP7A, F2, F2RL1, TGFB1, |
| | Eliminación de radicales superóxido (GO:0019430) | 8,33 | RAC1, NOD2, ABL2. |
| | Respuesta celular al radical oxígeno (GO:0071450) | 7,89 | |
| | Respuesta celular al superóxido | 7,89 | |

(GO:0071451)

| | |
|------------------------------|------|
| Respuesta al radical oxígeno | 7,32 |
|------------------------------|------|

(GO:0000305)

| | |
|-------------------------|------|
| Respuesta al superóxido | 7,32 |
|-------------------------|------|

(GO:0000303)

| | |
|--|--------------|
| Regulación positiva de la generación de aniones superóxido (GO:0032930) | 25,00 |
|--|--------------|

| | |
|-------------------------------|------|
| Proceso metabólico superóxido | 5,26 |
|-------------------------------|------|

(GO:0006801)

| | |
|------------------------|------|
| Regulación del proceso | 3,09 |
|------------------------|------|

metabólico de la especie reactiva
del oxígeno (GO:2000377)

| | |
|-----------------------------------|------|
| Respuesta a especies reactivas de | 2,59 |
|-----------------------------------|------|

oxígeno (GO:0000302)

| | |
|------------------------------|------|
| Respuesta celular a especies | 2,74 |
|------------------------------|------|

reactivas de oxígeno

(GO:0034614)

| | |
|---------------------------|------|
| Proceso metabólico de las | 2,82 |
|---------------------------|------|

especies reactivas del oxígeno

(GO:0072593)

| | |
|-----------------------------|------|
| Respuesta celular al estrés | 2,15 |
|-----------------------------|------|

oxidativo (GO:0034599)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación positiva de la | 3,60 |
|---------------------------|------|

actividad oxidoreductasa

(GO:0051353)

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|---|
| Aparato respiratorio | Regulación del proceso del sistema respiratorio (GO:0044065) | 17,65 | MECP2, NLGN3, ATP1A2, BPGM, PHOX2A, FUT8, |
| | Regulación del intercambio respiratorio gaseoso (GO:0043576) | 15,38 | CREB1, SOX2, PHF14, ATP7A, PHF14, FSTL3, |
| | Proceso del sistema respiratorio (GO:0003016) | 9,68 | NODAL, F2, ST3GAL1, GALNT3, |
| | Intercambio gaseoso respiratorio (GO:0007585) | 5,61 | CALR, ST6GALNAC4, |
| | Desarrollo del alveolo pulmonar (GO:0048286) | 5,56 | ARSB, FUT8, ALG1, PIGG, PIGO, |
| | Desarrollo pulmonar (GO:0030324) | 2,11 | BTN3A2, ERP29, F2RL1, NOD2, |
| | Desarrollo de tubo respiratorio (GO:0030323) | 2,08 | TGFB1, ANG, ABL2, RABGEF1, |
| | Desarrollo del sistema respiratorio (GO:0060541) | 1,86 | RNF19B, GALNT10, B4GALT1, ALG14, SUMO1, ATP1A2. |
| | | | |
| Regulación de proteínas | Heterooligomerización proteica (GO:0051291) | 3,64 | YWHAB, IGF1R, LIMS1, PRKAB1, |
| | Modificación de proteínas postraduccionales (GO:0043687) | 2,94 | USP10, TECPR1, ANXA7, OPTN, |
| | Estabilización de proteínas (GO:0050821) | 2,61 | TMEM74, FBXO7, LAMP1, BCL2L1, |
| | Regulación de la estabilidad | 2,38 | UBE2L3, NPEPPS, |

| | | | |
|---|--|-------------|--|
| | proteica (GO:0031647) | | PSMD10, RNF216, |
| | Autofagia(GO:0006914) | 2,23 | PSMB5, UBE2K, |
| | Mantenimiento de la localización de proteínas en la célula(GO:0032507) | 1,97 | XIAP, MDM4, CREB1, MAPK1, CALR, VHL, ANK2, |
| | Secreción de proteínas (GO:0009306) | 1,83 | KDEL1, SGOL1, TNFSF14, |
| | Poliubiquitinación de proteínas (GO:0000209) | 1,52 | ANKRD13C. |
| Respuesta a los niveles de oxígeno | Respuesta a los niveles de oxígeno (GO:0070482) | 2,96 | MDM4, MECP2, CDK4, NPEPPS, |
| | Respuesta celular a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036294) | 2,94 | TGFB1, ANG, EGLN3, HMOX1, SLC11A2, PAK1, |
| | Respuesta celular a los niveles de oxígeno (GO:0071453) | 2,69 | ADAM17, SRF, VHL, SLC9A1. |
| | Respuesta celular a hipoxia (GO:0071456) | 3,00 | |
| | Respuesta a hipoxia (GO:0001666) | 2,95 | |
| | Respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036293) | 2,90 | |
| Detoxificación | Respuesta a sustancias tóxicas (GO:0009636) | 3,11 | SLC7A11, MAPK1, CDK4, BAX, |
| | Respuesta a alcohol (GO:0097305) | 1,91 | GSTM3, SRF, ATP7A, SLC9A1, |

| | | | |
|---|---|-------------|---|
| | | | SSTR2, MTAP, CDK4, CALR, TGFB1, AACS, PSPH, CYP7A1. |
| Regulación de la apoptosis | Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA (GO:0008630) | 2,34 | USP28, BAX, HMOX1, PHLDA3, BRCA2, BCL2L2, |
| | Regulación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043281) | 2,28 | BCL2L1, SOX2, EGLN3, ACER2, SLC11A2, TNFSF14, BIRC5, |
| | Regulación positiva de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043280) | 2,26 | ACVR1C, NODAL, CASP7, XIAP, YWHAB, PSMD10, ATP7A. |
| | Cambios apoptóticos mitocondriales (GO:0008637) | 2,08 | |

Tabla S 2. . Funciones inhibidas por los miR-425 y 151a.

| Función general | Función específica | % inhibición | genes inhibidos |
|---------------------------------|---|-----------------|--|
| Degradación proteica | Regulación positiva de la actividad de la proteína ubiquitin transferasa (GO:0051443) | 1,30 | SKP1, PSMD8, PTEN, MDM2, CLU, GSK3B, |
| | Regulación de la actividad de la proteína ubiquitin | 1,13 | N4BP1, PPP1R15B, |

| | | |
|-------------------------------------|-------------|----------------|
| transferasa(GO:0051438) | | FKBP1A, FGFR3, |
| Regulación positiva del proceso | 4,40 | BCOR, RNF168, |
| catabólico proteasomal | | CBLB, AKT2, |
| dependiente de la ubiquitina | | CCND1, PPP2CB, |
| (GO:0032436) | | TNFRSF10B. |
| Regulación positiva del proceso | 3,70 | |
| catabólico proteasomal de | | |
| proteínas (GO:1901800) | | |
| Regulación positiva de la | 3,60 | |
| proteólisis implicada en el | | |
| proceso catabólico celular de | | |
| proteínas (GO:1903052) | | |
| Regulación positiva de la | 9,09 | |
| ubiquitinación de proteínas | | |
| implicadas en el proceso | | |
| catabólico dependiente de la | | |
| ubiquitina (GO:2000060) | | |
| Regulación positiva de la | 1,62 | |
| ubiquitinación de proteínas | | |
| (GO:0031398) | | |
| Ubiquitinación de proteínas | 1,36 | |
| implicadas en el proceso | | |
| catabólico dependiente de la | | |
| ubiquitina (GO:0042787) | | |
| Regulación del proceso catabólico | 2,62 | |
| proteasomal ubiquitin- | | |

dependiente de proteínas

(GO:0032434)

| | |
|-----------------------------|------|
| Monoubiquitination proteica | 3,06 |
|-----------------------------|------|

(GO:0006513)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación positiva de la | 1,89 |
|---------------------------|------|

proteólisis (GO:0045862)

| | |
|------------------------------|------|
| Regulación de la proteólisis | 1,66 |
|------------------------------|------|

implicada en el proceso

catabólico celular de proteínas

(GO:1903050)

| | |
|---------------------------------|------|
| Regulación positiva del proceso | 2,16 |
|---------------------------------|------|

catabólico de proteínas

(GO:0045732)

| | |
|---------------------------------|------|
| Regulación positiva del proceso | 1,47 |
|---------------------------------|------|

catabólico celular (GO:0031331)

| | |
|---------------------------------|------|
| Regulación positiva del proceso | 1,35 |
|---------------------------------|------|

catabólico (GO:0009896)

| | |
|-----------------------------------|------|
| Regulación del proceso catabólico | 1,59 |
|-----------------------------------|------|

celular de proteínas

(GO:1903362)

| | |
|----------------------------|------|
| Respuesta de sobrecarga RE | 7,41 |
|----------------------------|------|

(GO:0006983)

| | |
|----------------------------------|------|
| Respuesta al estrés del retículo | 1,35 |
|----------------------------------|------|

endoplásmico (GO:0034976)

| | |
|------------------------|------|
| Regulación del proceso | 2,16 |
|------------------------|------|

proteasomal catabólico de

| | | | |
|---------------------------------|---|-------------|---------------------------------------|
| | proteínas (GO:0061136) | | |
| Plegamiento de proteínas | Replegamiento de proteínas (GO:0042026) | 6,00 | HSPA8, FKBP1A, HSP90AA1, CLU, |
| | Plegamiento de proteínas mediado por chaperonas (GO:0061077) | 3,45 | HSPA8, CCT3, CCT5, RRM2, SOD2, ACACB, |
| | Ensamblaje complejo de proteínas mediadas por chaperones (GO:0051131) | 4,26 | PPAT, SLPI, GSK3B. |
| | Plegamiento de proteínas 'de novo' (GO:0006458) | 3,74 | |
| | Plegamiento de proteínas postraducional 'de novo' (GO:0051084) | 3,03 | |
| | Homotetramerización proteica (GO:0051289) | 2,59 | |
| | Tetramerización proteica (GO:0051262) | 1,95 | |
| | Regulación de la unión de proteínas (GO:0043393) | 1,12 | |
| Detoxificación | Respuesta al alcohol (GO:0097305) | 0,96 | CCND1, SOD2, SLC6A1, PTEN, |
| | Respuesta a etanol (GO:0045471) | 2,14 | CCT3, CCT5, |
| | Transporte de toxinas (GO:1901998) | 4,65 | MDM2, PPP2CB. |
| | Respuesta a sustancias tóxicas | 1,15 | |

| | | | |
|-----------------------------------|--|-------------|--|
| | (GO:0009636) | | |
| regulación de glúcidos | Respuesta a monosacáridos (GO:0034284) | 2,33 | SOD2, SOX4, BIRC5, PTEN, |
| | Regulación del proceso metabólico de glucosa(GO:0010906) | 3,17 | TXN2, MIDN, PPP1R3B, AKT2, EPM2AIP1, |
| | Regulación positiva del proceso metabólico de glucosa (GO:0010907) | 3,61 | SMEK1, GSK3B, MDM2, SLC6A1, MAP2K6, |
| | Respuesta a la glucosa (GO:0009749) | 2,01 | |
| | Respuesta a la hexosa(GO:0009746) | 1,90 | |
| | Proceso biosintético de glucógeno (GO:0005978) | 2,82 | |
| | Proceso metabólico del glucógeno (GO:0005977) | 2,03 | |
| | Regulación del proceso metabólico del glucógeno (GO:0070873) | 4,49 | |
| | Regulación positiva del proceso metabólico del glucógeno (GO:0070875) | 3,77 | |
| | Regulación positiva del proceso biosintético de glucógeno (GO:0045725) | 4,00 | |

| | |
|---|------|
| Proceso biosintético de glucano (GO:0009250) | 2,82 |
| Proceso metabólico del glucano (GO:0044042) | 2,01 |
| Proceso metabólico del glucano celular (GO:0006073) | 2,01 |
| Proceso biosintético de polisacáridos (GO:0000271) | 1,26 |
| Regulación del proceso biosintético de polisacáridos (GO:0032885) | 4,17 |
| Proceso de biosintético de polisacárido celular (GO:0033692) | 1,32 |
| Proceso metabólico del polisacárido(GO:0005976) | 1,02 |
| Proceso metabólico celular del polisacárido (GO:0044264) | 1,10 |
| Regulación del proceso metabólico del polisacárido (GO:0032881) | 3,88 |
| Proceso biosintético celular de carbohidratos (GO:0034637) | 1,25 |
| Regulación del proceso biosintético de carbohidratos (GO:0043255) | 2,73 |
| Regulación del proceso | 2,16 |

| | | | |
|-------------------------------|---|------|---------------------------------|
| | metabólico celular de carbohidratos (GO:0010675) | | |
| | Regulación positiva de proceso metabólico de carbohidratos (GO:0045913) | 2,10 | |
| | Regulación de proceso metabólico de carbohidratos(GO:0006109) | 2,03 | |
| | Regulación positiva del proceso metabólico celular carbohidratos (GO:0010676) | 2,31 | |
| | Respuesta a los carbohidratos (GO:0009743) | 3,23 | |
| | Respuesta celular al estímulo de carbohidratos (GO:0071322) | 2,13 | |
| regulación lípidos | Proceso de biosíntesis de fosfatidilinositol (GO:0006661) | 1,56 | PIP4K2A, INPP5E, OCRL, PTEN, |
| | Proceso metabólico de inositol fosfato (GO:0043647) | 1,69 | ACACB, AKT2, MAP2K6, |
| | Transporte de ácidos grasos (GO:0015908) | 1,89 | PPP1R3B, MYC, EPM2AIP1, |
| | Modificación de lípidos (GO:0030258) | 1,26 | GSK3B, MDM2, AGO1, FGFR3. |
| | Proceso metabólico de reserva de energía (GO:0006112) | 1,25 | |
| | Señalización mediada por lípidos | 1,01 | |

| | | | |
|-----------------------------------|---|-------------|---------------------------------------|
| | inositol (GO:0048017) | | |
| | Regulación del transporte de ácidos grasos (GO:2000191) | 3,85 | |
| Regulación de fibroblastos | Regulación negativa de la proliferación de fibroblastos (GO:0048147) | 3,70 | SOD2, MYC, MDM2, NRAS, SHCBP1, RAB14, |
| | Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0008543) | 1,85 | PPP2CB, AGO1, PTEN, FGFR3, GSK3B. |
| estrés oxidativo | Respuesta celular a especies reactivas de oxígeno (GO:0034614) | 1,38 | CCND1, MDM2, SOD2, PPP2CB, PPP1R15B, |
| | Respuesta a especies reactivas de oxígeno (GO:0000302) | 1,62 | MAP3K5, CLU, HSP90AA1. |
| | Proceso de biosíntesis de óxido nítrico (GO:0006809) | 1,99 | |
| | Respuesta al peróxido de hidrógeno (GO:0042542) | 2,56 | |
| | Regulación positiva del proceso biosintético de óxido nítrico (GO:0045429) | 2,88 | |
| | Regulación del proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0045428) | 2,40 | |
| | Proceso metabólico de óxido nítrico (GO:0046209) | 1,68 | |

| Respuesta a vitaminas (GO:0033273) | | 3,13 | |
|--|--|-------------|--|
| Regulación proteínas y péptidos | Estabilización proteica (GO:0050821) | 1,27 | SOX4 ,CLU, PTEN, MDM2, GSK3B, |
| | Regulación positiva del procesamiento de proteínas (GO:0010954) | 1,75 | TACC3, GDI1, THOP1, SOD2, N4BP1, AKT2, |
| | Regulación negativa del transporte intracelular de proteínas (GO:0090317) | 2,16 | TMEM30B, MIDN, SLC16A1, BIRC5, HSPA8, CCND1, |
| | Proceso metabólico peptídico (GO:0006518) | 1,08 | HSP90AA1. |
| | Regulación del procesamiento de proteínas (GO:0070613) | 1,01 | |
| | Regulación de la maduración de proteínas (GO:1903317) | 1,01 | |
| | Regulación positiva de la maduración proteica (GO:1903319) | 1,75 | |
| | Regulación positiva del transporte intracelular de proteínas (GO:0090316) | 1,34 | |
| | Regulación del transporte de péptidos (GO:0090087) | 0,93 | |
| | Regulación del transporte intracelular de proteínas | 1,41 | |

| | | | |
|--|---|-------------|----------------------------|
| | (GO:0033157) | | |
| | Regulación negativa del transporte de proteínas (GO:0051224) | 1,22 | |
| | Regulación de la secreción peptídica (GO:0002791) | 0,94 | |
| | Respuesta a proteínas topológicamente incorrectas (GO:0035966) | 1,16 | |
| Respuesta a oxígeno | Respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036293) | 1,10 | MDM2, TACC3, SOD2, PLOD2, |
| | Respuesta a los niveles de oxígeno (GO:0070482) | 1,05 | TXN2. |
| | Respuesta a la hipoxia (GO:0001666) | 1,12 | |
| Desarrollo del aparato respiratorio | Desarrollo pulmonar (GO:0030324) | 1,75 | NRAS, DICER1, THRB, DHCR7, |
| | Desarrollo de tubo respiratorio (GO:0030323) | 1,72 | FGFR3. |
| | Desarrollo del sistema respiratorio (GO:0060541) | 1,54 | |
| | Desarrollo del epitelio pulmonar (GO:0060428) | 2,82 | |
| Respuesta a iones | Respuesta a iones hierro (GO:0010039) | 3,70 | MDM2, CCND1, FKBP1A, SOD2, |
| | respuesta a iones metálicos | 1,64 | SLC6A1, GDI1, |

| | | | |
|-----------------------|---|------|---------------------------|
| | (GO:0010038) | | PTEN, GSK3B |
| Muerte celular | Cambios mitocondriales apoptóticos (GO:0008637) | 1,38 | SOD2, CLU, PPP2CB, GSK3B. |

Tabla S 3. Funciones inhibidas por el miR-93

| Función general | Función específica | % inhibición | genes inhibidos |
|----------------------------------|---|--------------|---|
| Respuesta a lesiones | Respuesta inflamatoria a heridas (GO:0090594) | 50,00 | TGFB1, F2R, HIF1A, F3, PDGFB, F2RL1, |
| | Cicatrización de la herida involucrada en la respuesta inflamatoria (GO:0002246) | 50,00 | CAV1, APOH, TGFB2, CTSS, CD47, CD28, |
| | Regulación de la cicatrización de heridas (GO:0061041) | 2,93 | NDEL1, CLOCK, ITGA2, TLR7, |
| | Regulación positiva de la respuesta a heridas (GO:1903036) | 3,56 | PTGER4, RORA, IER3, FEM1A, EPHA4, PTGIS |
| | Regulación negativa de la respuesta a heridas (GO:1903035) | 3,56 | |
| Regulación de neutrófilos | Muerte de bacterias mediada por neutrófilos (GO:0070944) | 40,00 | TUSC2, MYO1F, F2RL1, VAMP7, |
| | Muerte de células simbiotes mediada por neutrófilos (GO:0070943) | 33,33 | LYST, CCL5. |

| | | | |
|--|---|-------|---|
| | Citotoxicidad mediada por neutrófilos (GO:0070942) | 33,33 | |
| | Inmunidad mediada por neutrófilos (GO:0002446) | 16,13 | |
| | Desgranulación de neutrófilos (GO:0043312) | 15,38 | |
| | Activación de neutrófilos (GO:0042119) | 10,00 | |
| | Activación de neutrófilos implicada en la respuesta inmune (GO:0002283) | 13,33 | |
| Regulación proteica y peptídica | Plegamiento de proteínas mediado por chaperones (GO:0061077) | 5,81 | ANKRD13C, BTN3A1, BTN3A2, IFNAR1, PTGER4, |
| | Respuesta celular a proteínas topológicamente incorrectas (GO:0035967) | 5,66 | PAFAH1B1, ABCA1, F2RL1, ZNF384, TGFB1, |
| | Respuesta a proteínas topológicamente incorrectas (GO:0035966) | 5,61 | DNM1L, F2R, GNAS, GPAM, SCAMP5, LYST, |
| | Regulación de la unión a proteínas (GO:0043393) | 5,18 | HPS1, RNF19B, TRAF3IP2, |
| | Regulación positiva de la unión a proteínas (GO:0032092) | 7,84 | GNPTAB, TNFRSF21, |
| | Regulación de la estabilidad proteica (GO:0031647) | 4,92 | BLOC1S3, SPTBN1, TMOD3, HSPA8, |

| | | |
|--|--------------|--|
| Secreción de proteínas (GO:0009306) | 4,36 | CFL2, RPL9, RPL17, RPL14, RPL30, |
| Regulación negativa de la secreción de proteínas (GO:0050709) | 2,96 | RPL27, RPL7A, C12orf65, LIMA1, ETF1, GAK, RPL17- |
| Regulación de la secreción de proteínas (GO:0050708) | 2,54 | C18orf32, TWF1, ADD1, TRIOBP, |
| Regulación positiva de la secreción de proteínas (GO:0050714) | 3,32 | CAPZA2, CKAP2, EIF5A2, UPF1, RPS27A, MFN2, |
| Regulación de la secreción peptídica (GO:0002791) | 4,71 | HSPA4L, FAF2, CCND1, TMBIM6, |
| Desestabilización de proteínas (GO:0031648) | 13,16 | FKBP14, STC2, HERPUD1, YOD1, |
| Desmontaje del complejo de proteínas celulares (GO:0043624) | 5,08 | DNAJB9, DNAJB4, HDGF, DCTN1, |
| Localización de complejos de proteínas celulares (GO:0034629) | 40,00 | EIF2S1, XBP1, CREBRF, CAPRIN2, DAB2, TCF7L2, |
| Replegamiento de proteínas (GO:0042026) | 6,12 | CAV1, LRPAP1, RAN, SNAPIN, |
| Transporte de ER a Golgi por medio de vesículas (GO:0006888) | 4,46 | ITGA2, AKTIP, MAPRE3, APLP2, |
| La orientación de proteínas a ER (GO:0045047) | 3,53 | MDM2, MYLIP, CREB1, MAPK1, |
| Secreción peptídica | 4,28 | CCDC88C, SOX4, |

| | | |
|--|------|---|
| (GO:0002790) | | BMP2, ATP1B3, |
| Regulación del transporte de péptidos (GO:0090087) | 4,65 | WIZ, AAK1, GAPDH, FBXL3, |
| Regulación del procesamiento de proteínas (GO:0070613) | 3,35 | A1CF, PTEN, USP3, SMAD7, UNC45A, |
| Regulación positiva del procesamiento de proteínas (GO:0010954) | 4,02 | PTGES3, FKBP7, CEP72, WASL, MZT1, NACC2, |
| Regulación negativa del procesamiento de proteínas (GO:0010955) | 3,68 | B2M, TRAM1, TBC1D20, VTI1A, NRBP1, VAMP7, |
| Regulación de la maduración de proteínas (GO:1903317) | 3,35 | TRAPPC2, SEC16A, SEC23A, PFKFB2, |
| Regulación positiva de la maduración proteica (GO:1903319) | 4,02 | MIDN, KCNB1, REST, PDE3B, CCL5, PRKACB, |
| Regulación negativa de la maduración proteica (GO:1903318) | 3,68 | CPT1A, HIF1A, SYBU, RAB8B, CLOCK, SPCS1, |
| Estabilización de proteínas (GO:0050821) | 4,02 | BIRC5, PRKAR1A, RAPGEF4, SENP1, |
| Localización de proteínas en el retículo endoplásmico (GO:0070972) | 3,50 | CLN8, UBE2V2, CD46, SOCS5, SNX9, WAC, |
| Regulación positiva del transporte intracelular de | 3,47 | TRIM32, N4BP1, MAD2L1, SLC35F6, |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|--|
| | proteínas (GO:0090316) | | WHAZ, YWHAQ, THEM4, JUN, PPP3R1 |
| Regulación de antígenos | Inducción de tolerancia al antígeno propio (GO:0002513) | 40,00 | TGFB1, TGFB2, BTN3A1, PDPK1, PRKCB, STK11, PLEKHA1, MAPK1, CD28, PIK3R2, TXK, UBC, PRNP, PTEN, TNFRSF21, |
| | Procesamiento del antígeno y la presentación de antígeno peptídico exógeno vía MHC clase I, independiente de TAP (GO:0002480) | 5,26 | RPS27A, RACGAP1, DYNC1LI2, DCTN6, DCTN4, DCTN1, AP2A2, AP1G1, |
| | Procesamiento de antígenos y la presentación de antígeno peptídico exógeno vía MHC clase II (GO:0019886) | 3,83 | KIF23, ERAP1, CTSS, NPEPPS, B2M, PSMD11, PSMD4, SEC23A, |
| | Procesamiento del antígeno y la presentación del antígeno peptídico vía MHC clase II (GO:0002495) | 3,72 | HLA-F. |
| | Vía de señalización mediada por receptor de antígeno (GO:0050851) | 3,71 | |
| | Procesamiento del antígeno y la presentación del antígeno peptídico o polisacárido vía MHC clase II (GO:0002504) | 3,14 | |
| | Tratamiento del antígeno y la | 2,87 | |

| | | | |
|-----------------------------|---|--------------|--|
| | presentación del antígeno peptídico vía MHC clase I (GO:0002474) | | |
| | Tratamiento antigénico y presentación de antígeno peptídico exógeno vía MHC de clase I (GO:0042590) | 2,76 | |
| | Procesamiento de antígenos y la presentación de antígeno peptídico exógeno vía MHC de clase I, TAP-dependiente (GO:0002479) | 2,41 | |
| Regulación de Ig | Regulación positiva del cambio de isotipo a isotipos de IgA (GO:0048298) | 33,33 | BTN3A3, BTN3A2, RORA, ICAM1, CD46, CD28, |
| | Regulación del cambio de isotipo a isotipos de IgA (GO:0048296) | 28,57 | SOC55, TGFB1, WHSC1, B2M, PVR, |
| | Cambio de isotipo a isotipos IgA (GO:0048290) | 28,57 | LYST, HLA-F, MSH3, CNUGCC, |
| | Hipermutación somática de genes de inmunoglobulina (GO:0016446) | 8,70 | POLM, TRAF3IP2 |
| | Diversificación somática de las inmunoglobulinas (GO:0016445) | 7,14 | |
| | Recombinación somática de segmentos génicos de | 5,88 | |

inmunoglobulina (GO:0016447)

Regulación de la producción de 5,66

inmunoglobulina (GO:0002637)

Regulación de la respuesta 5,45

inmune mediada por

inmunoglobulina (GO:0002889)

Producción de inmunoglobulina 5,26

(GO:0002377)

Diversificación somática de las 5,00

inmunoglobulinas implicadas en

la respuesta inmune

(GO:0002208)

Recombinación somática de 5,00

genes de inmunoglobulina

implicados en la respuesta

inmune (GO:0002204)

Inmunoglobulina implicada en la 3,66

respuesta inmune mediada por

inmunoglobulina (GO:0002381)

Regulación de la respuesta 2,93

inmune adaptativa basada en la

recombinación somática de

receptores inmunes contruidos a

partir de dominios de

superfamilia de inmunoglobulinas

(GO:0002822)

| | | | |
|---|---|--------------|---|
| | Respuesta inmune adaptativa basada en la recombinación somática de receptores inmunes contruidos a partir de dominios de superfamilia de inmunoglobulina (GO:0002460) | 2,76 | |
| Regulación de aparato respiratorio | Diferenciación de neumocitos tipo II (GO:0060510) | 28,57 | NFIB, GATA6, CREB1, CAV1, |
| | Diferenciación de neumocitos tipo I (GO:0060509) | 25,00 | SOD2, HIF1A, MECP2, PBX3, |
| | Homeostasis gaseosa (GO:0033483) | 23,08 | SLC5A3, ATXN1, BMPR2, VEGFA, |
| | Diferenciación de células secretoras pulmonares (GO:0061140) | 14,29 | CRISPLD2, TGFBR2 ,GLI3, HEG1, HECA, WNT2B, SKI. |
| | Regulación del intercambio gaseoso respiratorio por el proceso del sistema neurológico (GO:0002087) | 12,50 | |
| | Desarrollo del pulmón (GO:0060430) | 11,76 | |
| | Regulación del intercambio gaseoso respiratorio (GO:0043576) | 10,71 | |
| | Regulación del proceso del sistema respiratorio | 10,53 | |

| | | | |
|--|--|--------------|---|
| | (GO:0044065) | | |
| | Diferenciación de células epiteliales pulmonares (GO:0060487) | 10,00 | |
| | Diferenciación de células pulmonares (GO:0060479) | 8,82 | |
| | Desarrollo del alveolo pulmonar (GO:0048286) | 5,48 | |
| | Desarrollo del epitelio pulmonar (GO:0060428) | 4,35 | |
| | Desarrollo de tubo respiratorio (GO:0030323) | 4,29 | |
| | Desarrollo pulmonar (GO:0030324) | 4,00 | |
| | Desarrollo del sistema respiratorio (GO:0060541) | 3,82 | |
| Regulación de quimiocinas y quimiotaxis | Quimiocina (motivo C-C) producción DE ligando 5 (GO:0071609) | 28,57 | MYO9B, NR4A1, CCL1, LYST, F3, VEGFA, PDGFB, |
| | Regulación de la vía de señalización mediada por quimiocina (GO:0070099) | 13,33 | F2RL1, CCL5, ITGA2, HMGB1, HMGB2, TGFβ1, |
| | Regulación de la quimiotaxis positiva (GO:0050926) | 9,52 | BMPR2, TUSC2, MAVS, HIF1A, |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis | 10,00 | MAPK9, MAVS,TLR7. |

| | | | |
|---|---|--------------|-----------------------------------|
| positiva(GO:0050927) | | | |
| | Quimiotaxis celular (GO:0060326) | 2,28 | |
| | Quimiotaxis positiva (GO:0050918) | 8,25 | |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis (GO:0050921) | 4,88 | |
| | Regulación de la quimiotaxis (GO:0050920) | 3,45 | |
| | Regulación positiva de la producción de quimioquinas (GO:0032722) | 5,80 | |
| | Producción de quimiocinas (GO:0032602) | 5,17 | |
| | Regulación de la producción de quimiocinas (GO:0032642) | 4,81 | |
| Regulación de células natural killer | Diferenciación de células T NK (GO:0001865) | 28,57 | TUSC2, LYST, HPS1, AP1G1, |
| | Regulación positiva de la activación de células asesinas naturales (GO:0032816) | 15,38 | BLOC1S3, PVR, RNF19B, TGFB2, TXK. |
| | Regulación de la activación de células asesinas naturales (GO:0032814) | 12,50 | |
| | Activación de células asesinas naturales (GO:0030101) | 3,94 | |
| | Citotoxicidad mediada por células | 2,99 | |

| | | | |
|-----------------------|---|--------------|---|
| | asesinas naturales (GO:0042267) | | |
| | Inmunidad mediada por células | 2,96 | |
| | asesinas naturales (GO:0002228) | | |
| Muerte celular | Regulación negativa de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1901029) | 28,57 | MDM2, F3, CYCS, SENP1, VEGFA, REST, NR4A1, MAPK9, EGLN3, EPHA7, HERPUD1, ACER2, F2R, MYC, |
| | Regulación de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1901028) | 5,83 | DNAJB6, HIP1, BIRC5, RNF34, TNFRSF10B, CASP2, BCL2L11, XIAP, CYLD, MCL1, |
| | Regulación positiva de la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1900740) | 5,38 | DAB2, PDPK1, ICAM1, TCF7L2, PEA15, FEM1, DAPK3, CAV1, MKNK2, TGFB1, RUNX3, SKIL, |
| | Regulación de la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1900739) | 5,38 | SGMS1, ACVR1B, BCL2L2, FIGNL1, TM6IM6, RRN3, NONO, SOD2, HIF1A, ZNF385A, |
| | Inserción de proteínas en la | 5,15 | TRIM32.DNM1L, |

| | | |
|--|--------------|---|
| membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:0001844) | | TP53INP1, PLAGL2, PTEN, NACC2, RNF3, SLC4A7, FOXC1, USP28, |
| Cambios mitocondriales apoptóticos (GO:0008637) | 4,89 | CDKN1A, IER3, E2F1, DYRK2, |
| Permeabilización de la membrana externa mitocondrial implicada en la muerte celular programada (GO:1902686) | 4,86 | TOPORS, PYGL, TMEM123, PTGIS, H1FO, ADD1, HMGB1, HMGB2, |
| Regulación positiva de la permeabilidad de la membrana mitocondrial implicada en el proceso apoptótico (GO:1902110) | 4,86 | ACIN1, SLC35F6, YWHAZ, YWHAQ, THEM4, JUN, PPP3R1. |
| Regulación positiva de la ruta de señalización apoptótica intrínseca en respuesta a daño del DNA (GO:1902231) | 25,00 | |
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta a daño del DNA (GO:0008630) | 5,15 | |
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA por el mediador de la clase p53 (GO:0042771) | 3,33 | |

Regulación positiva de la vía de
señalización apoptótica
extrínseca a través de receptores
de dominio de muerte
(GO:1902043)

11,76

Regulación negativa de la vía de
señalización apoptótica
extrínseca a través de receptores
del dominio de muerte
(GO:1902042)

7,02

Regulación de la vía de
señalización apoptótica
extrínseca vía receptores de
dominio de muerte (GO:1902041)

6,67

Vía de señalización apoptótica
extrínseca vía receptores del
dominio de muerte (GO:0008625)

3,85

Regulación negativa de la vía de
señalización apoptótica intrínseca
(GO:2001243)

5,92

Regulación positiva de la vía de
señalización apoptótica
(GO:2001235)

5,10

Regulación negativa de la vía de
señalización
apoptótica(GO:2001234)

4,68

| | |
|---|------|
| Vía de señalización apoptótica extrínseca (GO:0097191) | 4,46 |
| Regulación de la vía de señalización apoptótica extrínseca (GO:2001236) | 4,14 |
| Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica extrínseca (GO:2001237) | 3,77 |
| Vía de señalización apoptótica extrínseca en ausencia de ligando (GO:0097192) | 3,63 |
| Muerte celular programada por desarrollo (GO:0010623) | 5,56 |
| Proceso necroptótico (GO:0070266) | 5,00 |
| Muerte celular necrótica (GO:0070265) | 5,33 |
| Muerte celular necrótica programada (GO:0097300) | 4,41 |
| Regulación negativa de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043154) | 4,97 |
| Regulación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso | 4,89 |

| | | | |
|-----------------------------|---|-------|---|
| | apoptótico (GO:0043281) | | |
| | Activación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0006919) | 4,26 | |
| | Regulación positiva de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptóticos(GO:0043280) | 4,23 | |
| | Ejecución de la apoptosis (GO:0097194) | 3,56 | |
| | Desmontaje de componentes celulares implicados en la fase de ejecución de la apoptosis (GO:0006921) | 3,45 | |
| estrés oxidativo | Regulación de la respuesta al estrés oxidativo (GO:1902882) | 5,41 | MDM2, MELK, MCL1, KDM6B, |
| | Regulación de generación de aniones superóxido (GO:0032928) | 13,33 | PLEKHA1, NONO, SOD2, EZH2, HIF1A, OXR1, |
| | Regulación negativa de la respuesta al estrés oxidativo (GO:1902883) | 4,11 | PKD2, TP53INP1, F2RL1, TGFB1, SESN2, SESN3, |
| | Regulación negativa de la respuesta celular al estrés oxidativo (GO:1900408) | 4,11 | FASN, RFK, SLC19A1, TPK1, CYB5A, STC2, |

| | | |
|--|--------------|---------------------------------------|
| Regulación de la respuesta celular al estrés oxidativo (GO:1900407) | 3,77 | CCND1 , ITGA2, JUN, PPP1R15B, |
| Respuesta celular al estrés oxidativo (GO:0034599) | 2,89 | TXNIP, CDKN1A, TUSC2, IER3, |
| Regulación positiva de la generación de aniones superóxido (GO:0032930) | 25,00 | PDGFB, SH3PXD2A, TGFBR2, GRB2, |
| Regulación del proceso metabólico del superóxido (GO:0090322) | 7,41 | MCL1, RORA, WASL, ICAM1, CPS1, MAPK9, |
| Generación de aniones superóxido (GO:0042554) | 6,12 | CAV1, PTGIS, PLEKHA1EZH2. |
| Proceso metabólico del superóxido (GO:0006801) | 4,55 | |
| Respuesta celular a hidroperóxidos (GO:0071447) | 20,00 | |
| Respuesta a hidroperóxidos (GO:0033194) | 11,76 | |
| Respuesta al peróxido de hidrógeno (GO:0042542) | 4,17 | |
| Respuesta celular al peróxido de hidrógeno (GO:0070301) | 2,88 | |
| Regulación de la ruta de señalización apoptótica intrínseca inducida por estrés oxidativo (GO:1903376) | 15 | |

| | |
|--|------|
| Regulación de la ruta de señalización apoptótica intrínseca inducida por el estrés oxidativo (GO:1902175) | 6,67 |
| Regulación negativa de la ruta de señalización apoptótica intrínseca inducida por el estrés oxidativo (GO:1902176) | 6,52 |
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al estrés oxidativo (GO:0008631) | 5,95 |
| Muerte celular en respuesta al estrés oxidativo (GO:0036473) | 4,59 |
| Regulación de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo (GO:1903201) | 4,71 |
| Regulación positiva del proceso metabólico de las especies reactivas del oxígeno (GO:2000379) | 6,82 |
| Regulación del proceso metabólico de las especies reactivas del oxígeno (GO:2000377) | 4,19 |
| Respuesta a las especies reactivas de oxígeno (GO:0000302) | 3,64 |

| | | | |
|---|--------------|--|---------------|
| Proceso metabólico de las especies reactivas del oxígeno (GO:0072593) | 3,56 | | |
| Proceso metabólico del óxido nítrico (GO:0046209) | 5,08 | | |
| Regulación del proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0045428) | 4,80 | | |
| Proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0006809) | 4,64 | | |
| Regulación positiva del proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0045429) | 3,74 | | |
| Respuesta celular a las especies reactivas de oxígeno (GO:0034614) | 2,79 | | |
| Respuesta celular a las vitaminas (GO:0071295) | 7,41 | | |
| Respuesta a la vitamina D (GO:0033280) | 7,32 | | |
| Respuesta a vitaminas (GO:0033273) | 7,29 | | |
| Proceso metabólico de la vitamina hidrosoluble (GO:0006767) | 2,45 | | |
| Regulación degranulación de eosinófilos | 25,00 | | MYO1F, F2RL1, |

| | | | |
|--------------------------------|--|--------------|---|
| de eosinófilos | (GO:0043308) | | CCL5, VAMP7, |
| | Activación de los eosinófilos en la respuesta inmune (GO:0002278) | 25,00 | PTGER4. |
| | Inmunidad mediada por eosinófilos (GO:0002447) | 25,00 | |
| | Activación de eosinófilos (GO:0043307) | 16,67 | |
| | Migración de eosinófilos (GO:0072677) | 8,00 | |
| Regulación de células T | Selección de células T timicas negativas (GO:0045060) | 25,00 | IRF1, CYLD, PTGER4, RORA, |
| | Selección de células T negativas (GO:0043383) | 20,00 | STK11, PKNX1, MINK1, CD46, |
| | Selección de células T timicas (GO:0045061) | 18,52 | CD28, ITPKB, SOCS5, SOX4, |
| | Selección positiva de células T timicas (GO:0045059) | 12,50 | TGFB1, B2M, TGFB2, GLI3, TXK, |
| | Regulación negativa de la diferenciación de células T alfa-beta (GO:0046639) | 11,76 | BTN3A1, PDPK1, MAPK1, PIK3R2, UBC, PTEN, |
| | Regulación negativa del proceso apoptótico de las células T (GO:0070233) | 10,71 | RPS27A, BTN3A3, BTN3A2, PVR, LYST, HLA-F, CCL5, |
| | Regulación negativa de la diferenciación de células T | 10,53 | HIF1A, GPAM, BCL2L11, IGF2, |

| | | |
|-----------------------------------|------|-----------------|
| (GO:0045581) | | PRNP, TNFRSF21, |
| Selección de células T | 9,43 | ICAM1, F2RL1, |
| (GO:0045058) | | MAP3K14, CD47, |
| Diferenciación de células T | 8,16 | CAV1, GRB2. |
| reguladoras (GO:0045066) | | |
| Regulación negativa de la | 6,90 | |
| activación de células T alfa-beta | | |
| (GO:0046636) | | |
| Regulación de la proliferación de | 6,90 | |
| células T alfa-beta (GO:0046640) | | |
| Regulación positiva de la | 6,78 | |
| diferenciación de células T alfa- | | |
| beta (GO:0046638) | | |
| Diferenciación de células T alfa- | 6,56 | |
| beta (GO:0046632) | | |
| Proceso apoptótico de células T | 6,02 | |
| (GO:0070231) | | |
| Regulación positiva de la | 5,95 | |
| activación de células T alfa-beta | | |
| (GO:0046635) | | |
| Proliferación de células T | 5,80 | |
| activadas (GO:0050798) | | |
| Diferenciación de células T en el | 5,61 | |
| timo (GO:0033077) | | |
| Activación de células T alfa-beta | 5,52 | |
| (GO:0046631) | | |

| | |
|--|------|
| Regulación de la activación de células T alfa-beta (GO:0046634) | 5,41 |
| Homeostasis de las células T (GO:0043029) | 5,36 |
| Regulación de la diferenciación de células T alfa-beta (GO:0046637) | 5,13 |
| Diferenciación de células T (GO:0030217) | 5,06 |
| Regulación del proceso apoptótico de células T (GO:0070232) | 5,00 |
| Regulación de la proliferación de células T activadas (GO:0046006) | 4,92 |
| Regulación negativa de la activación de células T (GO:0050868) | 4,90 |
| Diferenciación de células T implicada en la respuesta inmune (GO:0002292) | 4,71 |
| La activación de las células T implicada en la respuesta inmune (GO:0002286) | 4,65 |
| Inmunidad mediada por células T (GO:0002456) | 4,47 |
| Camino de señalización del | 3,99 |

receptor de células T

(GO:0050852)

Diferenciación de células T alfa- 3,75

beta CD4-positiva implicada en la
respuesta inmune (GO:0002294)

Diferenciación de células T-helper 3,75

(GO:0042093)

Activación de células T alfa-beta 3,61

implicada en la respuesta inmune
(GO:0002287)

Diferenciación de las células T 3,61

alfa-beta implicada en la
respuesta inmune (GO:0002293)

Regulación positiva de la 3,60

diferenciación de células T
(GO:0045582)

Regulación de la diferenciación 3,54

de células T (GO:0045580)

Regulación de la proliferación de 3,52

células T (GO:0042129)

Proliferación de células T 3,36

(GO:0042098)

Regulación positiva de la 3,03

activación de células T
(GO:0050870)

Regulación positiva de la 2,99

| | | | |
|--|--|--------------|---|
| | proliferación de células T (GO:0042102) | | |
| | Coestimulación de células T (GO:0031295) | 2,33 | |
| Respuesta a microorganismos | Matar mediante células simbiontes del huésped (GO:0051873) | 25,00 | TUSC2, TGFB1, ATP6V0E1, TRIM8, BCL2L11, NUP153, |
| | Romper mediante células simbiontes del huésped (GO:0051852) | 25,00 | MICB, MAVS, RNF216, REST, F2RL1, CCL5, JUN, |
| | Respuesta a la respuesta inmune del huésped (GO:0052572) | 20,00 | ITCH, VAMP7. |
| | Respuesta a la respuesta inmune de otro organismo implicado en la interacción simbiótica (GO:0052564) | 20,00 | |
| | Respuesta al huésped (GO:0075136) | 11,76 | |
| | Respuesta a las defensas del huésped (GO:0052200) | 11,76 | |
| | Regulación negativa por huésped de la transcripción viral (GO:0043922) | 11,11 | |
| | Modificación por el huésped de la morfología del simbionte o fisiología (GO:0051851) | 8,06 | |

| | | | |
|-----------------------|---|--------------|---|
| | Modulación por simbionte del proceso celular del huésped (GO:0044068) | 6,90 | |
| | Modulación por el huésped de la transcripción viral (GO:0043921) | 6,12 | |
| | Modulación por el huésped de la transcripción del simbionte (GO:0052472) | 6,12 | |
| | Regulación de la respuesta de la defensa al virus por el huésped (GO:0050691) | 5,36 | |
| | Interacción con el anfitrión (GO:0051701) | 2,38 | |
| Detoxificación | Respuesta celular al etanol (GO:0071361) | 22,22 | MDM2, SLC30A1, SLC7A11, CDKN1A, |
| | Respuesta al etanol (GO:0045471) | 5,71 | CPOX, CPS1, MAPK1, MAPK9, |
| | Respuesta a sustancias tóxicas (GO:0009636) | 5,10 | CCL5, JAK1, SKIL, SLC6A4, XBP1, |
| | Respuesta al alcohol (GO:0097305) | 4,62 | IGF2, RORA, PDGFB, ICAM1, |
| | Respuesta celular al alcohol (GO:0097306) | 4,32 | STAT3, ABCA1, CCND1, SOD2, TGFB1, STC2, TGFB2, SLC2A4, ITGB1, TP53INP1, |

| | | | |
|-------------------------------|---|--------------|--|
| | | | PTEN, TXNIP. |
| Respuesta al oxígeno | Homeostasis de oxígeno (GO:0032364) | 20,00 | MDM2, CDKN1A, RORA, MECP2, |
| | Respuesta a la hiperoxia (GO:0055093) | 10,00 | E2F1, VEGFA, PDGFB, ICAM1, |
| | Respuesta al aumento de los niveles de oxígeno (GO:0036296) | 10,00 | NPEPPS, CAV1, SOD2, TGFB1, |
| | Regulación de la transcripción de RNA polimerasa II promotor en respuesta a la hipoxia (GO:0061418) | 9,46 | STC2, BMP2, EGLN3, SLC6A4, SLC2A4, HIF1A, PTGIS, UBC, ITGA2, |
| | Respuesta celular a la hipoxia (GO:0071456) | 7,69 | GATA6, HIF1AN, SMAD4, RPS27A, |
| | Respuesta celular a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036294) | 7,51 | TCEB1. |
| | Respuesta celular a los niveles de oxígeno(GO:0071453) | 7,33 | |
| | Respuesta a la hipoxia (GO:0001666) | 5,95 | |
| | Respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036293) | 5,85 | |
| | Respuesta a los niveles de oxígeno(GO:0070482) | 5,75 | |
| Regulación endosoma/li | Transporte de endosoma a lisosoma (GO:0008333) | 20,00 | DAB2, EEA1, MAPK1, LYST, |

| | | | |
|-------------------|--|--------------|---|
| sosoma | Transporte de endosoma temprano a endosoma tardío (GO:0045022) | 17,39 | VEGFA, ACAP2, TOLLIP, MICALL1, LAMTOR1, |
| | Localización de proteínas a endosomas (GO:0036010) | 19,05 | RAB22A, RAB5B, STX6, AKTIP, |
| | Organización de endosomas (GO:0007032) | 14,55 | TMEM127, SNX16, TRAK1, HOOK3, |
| | Transporte lisosomal (GO:0007041) | 14,63 | HOOK1, VAMP7, RAB12, ANKFY1, SNAPIN, AKTIP, M6PR, ATG14, AP1G1. |
| ubiquitina | Regulación de la ubiquitinación ligada a la proteína K63 (GO:1900044) | 18,18 | UBOX5, ITCH, ANAPC5, SASH1, MARCH6, ZFP91, |
| | Regulación de la poliubiquitinación de proteínas (GO:1902914) | 16,67 | CDC16, UBE2L3, UBE2V2, UBE2Q2, TOPORS, ARIH2, |
| | Proceso catabólico de proteína SCF-dependiente dependiente de ubiquitina proteasomal (GO:0031146) | 10,53 | NPEPPS, KLHL20, MKRN1, PSMD11, HUWE1, DZIP3, UBC, TRIM32, |
| | Proceso catabólico de la proteína ubiquitina-dependiente asociada a la ER (GO:0030433) | 9,72 | RNF216, PSMD4, UBR5, RNF34, RNF115, TNKS2, |
| | Desubiquitinación ligada a la | 8,16 | UBE2O, XIAP, |

| | | |
|---------------------------------|------|------------------|
| proteína K63 (GO:0070536) | | RPS27A, FBXO31, |
| Ubiquitinación ligada a la | 7,87 | FBXL5, FBXL7, |
| proteína K63 (GO:0070534) | | FBXL3, UBE2J1, |
| Proceso catabólico de proteína | 7,41 | FOXRED2, ERLIN2, |
| dependiente de ubiquitina a | | TMEM67, YOD1, |
| través de la vía de cuerpo | | DNAJB9, DNAJC10, |
| clasificación multivesicular | | ZRANB1, CYLD, |
| (GO:0043162) | | USP16, TSG101, |
| Ubiquitinación ligada a la | 7,08 | DAB2, SOCS5, |
| proteína K48 (GO:0070936) | | SEN1, GNA12, |
| Regulación positiva del proceso | 6,90 | WAC, N4BP1, |
| catabólico proteasomal | | USP28, USP21, |
| dependiente de ubiquitina- | | USP32, USP3, |
| dependiente (GO:0032436) | | OTUD4, MDM2, |
| Poliubiquitinación de proteínas | 6,55 | FBXO10, MYLIP, |
| (GO:0000209) | | UBE3B, FEM1B, |
| Regulación de proteasomal | 6,04 | FEM1A, MAD2L1, |
| ubiquitin-dependiente del | | RYBP, PTEN, |
| proceso catabólico de proteínas | | SMAD7, CNOT4, |
| (GO:0032434) | | TRIM37, RNF220, |
| Desubiquitinación de | 5,29 | CAV1, SOX4, |
| proteínas(GO:0016579) | | SPOPL. |
| Ubiquitinación de proteínas | 5,21 | |
| implicadas en el proceso | | |
| catabólico dependiente de la | | |
| ubiquitina (GO:0042787) | | |

| | | | |
|-------------------|--|-------|-------------|
| | Regulación de la actividad de la ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051438) | 5,08 | |
| | Monoubiquitination de proteínas (GO:0006513) | 5,05 | |
| | Regulación negativa del proceso catabólico proteasomal dependiente de la ubiquitina (GO:0032435) | 5,00 | |
| | Autoubiquitination de proteínas (GO:0051865) | 4,42 | |
| | Proteína ubiquitinación ligada a K11 (GO:0070979) | 4,29 | |
| | Regulación negativa de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031397) | 4,19 | |
| | Regulación negativa de la actividad ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051444) | 4,15 | |
| | Regulación positiva de la actividad ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051443) | 4,04 | |
| | Regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031398) | 3,04 | |
| Regulación | Secreción de interleuquina-6 | 11,11 | F2RL1, F2R, |

| | | | |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------|------------------|
| de interleuquin as | (GO:0072604) | | TUSC2, PRNP, |
| | Regulación positiva de la | 18,18 | STAT3, GAB1, |
| | secreción de interleuquina-6 | | JAK1, ACSL4, |
| | (GO:2000778) | | CD46, TGFB1, |
| | Vía de señalización mediada por | 8,00 | TNFRSF21, MYLK3, |
| | interleuquina-6 (GO:0070102) | | ICAM1, MAPK9, |
| | Respuesta a la interleuquina-6 | 4,92 | CCL5, HIF1A, |
| | (GO:0070741) | | PTGIS, HAS2, |
| | Respuesta celular a la | 5,77 | PRKCI, TLR7, |
| | interleuquina-6 (GO:0071354) | | MAVS, IFNAR1, |
| | Producción de interleuquina-17 | 7,50 | ABCA1. |
| | (GO:0032620) | | |
| | Regulación de la producción de | 7,89 | |
| | interleuquina-17 (GO:0032660) | | |
| | Regulación negativa de la | 14,29 | |
| | producción de interleuquina-17 | | |
| | (GO:0032700) | | |
| | Regulación de la secreción de | 7,41 | |
| | interleuquina-8 (GO:2000482) | | |
| | Regulación positiva de la | 11,11 | |
| | secreción de interleuquina-8 | | |
| | (GO:2000484) | | |
| | Producción de interleuquina-8 | 3,70 | |
| | (GO:0032637) | | |
| | Regulación de la producción de | 3,92 | |
| | interleuquina-8 (GO:0032677) | | |

| | | | |
|---|---|--------------|---------------------------------------|
| | Respuesta a la interleuquina-15 (GO:0070672) | 8,00 | |
| | Producción de interleuquina-10 (GO:0032613) | 6,25 | |
| | Regulación de la producción de interleuquina-10 (GO:0032653) | 4,84 | |
| | Regulación positiva de la producción de interleuquina-10 (GO:0032733) | 8,00 | |
| | Secreción de interleucina-10 (GO:0072608) | 10,53 | |
| | Respuesta a la interleuquina-1 (GO:0070555) | 4,88 | |
| | Respuesta celular a la interleuquina-1 (GO:0071347) | 6,42 | |
| | Producción de interleuquina-1 beta (GO:0032611) | 3,15 | |
| | Producción de interleuquina-1 (GO:0032612) | 2,86 | |
| Regulación de citoquinas | Proceso de biosíntesis de interferón tipo I (GO:0045351) | 13,33 | SEMA7A, IFNAR1, IFNAR2, |
| | Producción de interferón tipo I (GO:0032606) | 5,43 | PAFAH1B1, CCL5, CAV1, JAK1, HIF1A, |
| | Regulación de la producción de interferón tipo I (GO:0032479) | 5,15 | ADAR, TXK, CREBRF, BTN3A1, |
| | Regulación positiva de la | 4,06 | BTN3A2, PTGER4, |

| | | |
|---|--------------|---|
| producción de interferón tipo I (GO:0032481) | | ABCA1, F2R, GPAM, SCAMP5, |
| La regulación de la vía de señalización mediada por el interferón tipo I (GO:0060338) | 8,06 | RNF19B, TNFRSF21, CYLD, ITCH, IRF1, CD28, |
| Regulación negativa de la producción de interferón tipo I(GO:0032480) | 7,14 | EREG, ASB1, TLR7, TUSC2, F2RL1, TGFB1, UBC, |
| Respuesta al interferón tipo I (GO:0034340) | 3,26 | GATA6, TAX1BP1, MAVS, PRNP, |
| Respuesta celular al interferón tipo I (GO:0071357) | 3,27 | PCBP2, RPS27A, POLR3G, POLR3F, |
| Vía de señalización del interferón tipo I (GO:0060337) | 3,27 | POLR3A, TRIM32, RNF216, ICAM1, |
| Respuesta al interferón-alfa (GO:0035455) | 11,11 | CALCOCO2, DAPK3, B2M, |
| Producción de interferón beta (GO:0032608) | 8,75 | GAPDH, HLA-F, RUNX3, KLHL20. |
| Regulación de la producción de interferón-beta (GO:0032648) | 8,97 | |
| Regulación positiva de la producción de interferón-beta (GO:0032728) | 9,80 | |
| Secreción de interferón gamma (GO:0072643) | 16,67 | |
| Producción de interferón gamma | 5,70 | |

(GO:0032609)

| | |
|---|------|
| Regulación de la producción de interferón gamma(GO:0032649) | 2,90 |
|---|------|

| | |
|--|------|
| Respuesta al interferón gamma (GO:0034341) | 2,47 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Respuesta celular al interferón-gamma (GO:0071346) | 2,54 |
|--|------|

| | |
|---|------|
| Vía de señalización mediada por interferón gamma (GO:0060333) | 2,00 |
|---|------|

| | |
|---|------|
| Regulación de la producción de citoquinas por macrófagos (GO:0010935) | 9,09 |
|---|------|

| | |
|--|------|
| Producción de citoquinas por macrófagos (GO:0010934) | 8,70 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Producción de citoquinas por leucocitos mieloides (GO:0061082) | 6,67 |
|--|------|

| | |
|---|------|
| Regulación positiva de la vía de señalización mediada por citoquinas (GO:0001961) | 5,88 |
|---|------|

| | |
|--|------|
| Regulación positiva de la respuesta al estímulo de citoquinas (GO:0060760) | 5,49 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Regulación de la vía de señalización mediada por citoquinas (GO:0001959) | 4,94 |
|--|------|

| | |
|---|------|
| Regulación de la respuesta al estímulo de citoquinas(GO:0060759) | 4,56 |
| Regulación negativa de la vía de señalización mediada por citoquinas (GO:0001960) | 4,49 |
| Regulación negativa de la respuesta al estímulo de citoquinas (GO:0060761) | 4,04 |
| Regulación negativa de la secreción de citoquinas (GO:0050710) | 3,70 |
| Secreción de citoquinas (GO:0050663) | 3,67 |
| Regulación positiva del proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042108) | 3,64 |
| Regulación negativa de la producción de citoquinas (GO:0001818) | 3,58 |
| Proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042089) | 3,17 |
| Proceso metabólico de citoquinas (GO:0042107) | 3,11 |
| Regulación del proceso de biosíntesis de citoquinas | 2,87 |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|--|
| | (GO:0042035) | | |
| | Regulación positiva de la secreción de citoquinas (GO:0050715) | 2,81 | |
| | Regulación de la secreción de citoquinas (GO:0050707) | 2,61 | |
| UPR | RE UPR (GO:0030968) | 6,70 | FKBP14, HERPUD1, |
| | Regulación del RE UPR (GO:1900101) | 15,38 | ADD1, DNAJB9, DNAJB4, HDGF, |
| | Respuesta celular UPR (GO:0034620) | 6,32 | DCTN1, EIF2S1, XBP1, CCND1, |
| | Respuesta a proteínas desplegadas (GO:0006986) | 6,10 | STC2, YOD1, CREBRF, MFN2, |
| | Activación de la actividad de la proteína de señalización implicada en la respuesta de proteína desplegada (GO:0006987) | 5,63 | HSPA8, HSPA4L, FAF2, TMBIM6, PPP1R15B, CCDC47. |
| | Respuesta de sobrecarga del ER (GO:0006983) | 7,14 | |
| | | | |
| Regulación de monocitos | Diferenciación de monocitos (GO:0030224) | 6,76 | MYH9, VEGFA, JUN, MYC, ACIN1. |
| | Regulación de la diferenciación de monocitos (GO:0045655) | 10,71 | |
| | Regulación positiva de la diferenciación de monocitos | 15,38 | |

| (GO:0045657) | | | |
|----------------------------------|---|--------------|------------------|
| regulación de lípidos | Importación de colesterol | 15,38 | SESN2, CROT, |
| | (GO:0070508) | | CPT1A, TYSND1, |
| | Absorción intestinal de | 12,50 | ACOX1, ABCA1, |
| | colesterol (GO:0030299) | | ABCG8, LAMTOR1, |
| | Regulación de la homeostasis del | 12,50 | MAPK9, ACSL4, |
| | colesterol (GO:2000188) | | MGLL, CPS1, |
| | Digestión de lípidos | 10,00 | TCF7L2, FASN, |
| | (GO:0044241) | | CAV1, SIK1, |
| | Regulación de la beta-oxidación | 8,70 | PRKACB, APOH, |
| | de ácidos grasos (GO:0031998) | | GPAM, ATG14, |
| | Regulación del proceso de | 8,33 | LDLR, PTGES3, |
| | biosíntesis de triglicéridos | | STK11, DEGS1, |
| | (GO:0010866) | | PTGIS, QKI, SCD, |
| | Regulación del proceso catabólico | 8,22 | MSMO1, LIAS, |
| | lipídico (GO:0050994) | | E2F1, GNAS, YY1, |
| | Respuesta celular a ácidos grasos | 8,16 | PDHB, MFSD2A, |
| | (GO:0071398) | | LYST, TGFB1, |
| | Regulación negativa del proceso | 8,11 | TGFBR2, IGF2, |
| | catabólico lipídico (GO:0050995) | | CRTC3, RORA, |
| | Proceso catabólico de | 7,89 | PDGFB, REST, |
| | triglicéridos (GO:0019433) | | PDE3B, SAMD8, |
| | Regulación del proceso | 7,84 | CREB1, BMP2, |
| | metabólico de los triglicéridos | | PIK3R2, RB1, |
| | (GO:0090207) | | BSCL2, PI4KA, |
| | Proceso catabólico | 7,69 | MTMR3, PIP4K2A, |

| | | |
|----------------------------------|------|--------------------|
| glicerofosfolípido (GO:0046475) | | PIP4K2C, OCRL, |
| Proceso catabólico del | 7,69 | IP6K1, PTEN, CLN8, |
| glicerolípido (GO:0046503) | | VLDLR, APLP2, |
| Beta-oxidación de ácidos grasos | 7,41 | INPP5F, SPTLC2, |
| utilizando acil-CoA oxidasa | | CERS2, SGPL1, |
| (GO:0033540) | | SGMS1, ACER2, |
| Regulación positiva del proceso | 7,41 | UGCG, RORA. |
| de biosíntesis de triglicéridos | | |
| (GO:0010867) | | |
| Proceso biosintético de | 7,38 | |
| esfingolípidos (GO:0030148) | | |
| Proceso catabólico lípido | 7,32 | |
| neutro(GO:0046461) | | |
| Respuesta al colesterol | 7,32 | |
| (GO:0070723) | | |
| Respuesta a ácidos grasos | 6,41 | |
| (GO:0070542) | | |
| Homeostasis del colesterol | 6,20 | |
| (GO:0042632) | | |
| Regulación negativa del proceso | 5,69 | |
| metabólico lipídico (GO:0045833) | | |
| Homeostasis de los lípidos | 5,64 | |
| (GO:0055088) | | |
| Regulación negativa del proceso | 5,41 | |
| de biosíntesis lipídica | | |
| (GO:0051055) | | |

| | |
|--|------|
| Proceso metabólico de triglicéridos (GO:0006641) | 5,14 |
| Regulación del proceso metabólico lipídico (GO:0019216) | 4,95 |
| Proceso metabólico de lípidos neutros (GO:0006638) | 4,87 |
| Regulación del proceso de biosíntesis lipídica (GO:0046890) | 4,78 |
| Regulación del proceso metabólico de los ácidos grasos (GO:0019217) | 4,44 |
| Beta-oxidación de ácidos grasos (GO:0006635) | 4,24 |
| Regulación de la actividad de la quinasa lipídica (GO:0043550) | 4,12 |
| Regulación positiva del proceso de biosíntesis lipídica (GO:0046889) | 4,03 |
| Regulación del transporte del colesterol (GO:0032374) | 3,61 |
| Proceso de biosíntesis de ácidos grasos (GO:0006633) | 3,50 |
| Regulación positiva del proceso metabólico lipídico (GO:0045834) | 3,48 |
| Proceso metabólico de ácidos grasos de cadena larga | 3,43 |

(GO:0001676)

Proceso catabólico de los lípidos 3,43

celulares (GO:0044242)

Proceso biosintético de 3,31

triglicéridos (GO:0019432)

Transporte de ácidos grasos 3,27

(GO:0015908)

Proceso de biosíntesis de lípidos 3,21

neutros (GO:0046460)

Oxidación de ácidos grasos 3,18

(GO:0019395)

Proceso catabólico de ácidos 3,16

grasos (GO:0009062)

Oxidación de lípidos 3,13

(GO:0034440)

Transporte de colesterol 3,03

(GO:0030301)

Proceso de biosíntesis de ácidos 2,92

grasos insaturados (GO:0006636)

Modificación de lípidos 2,84

(GO:0030258)

Proceso metabólico derivado de 2,60

ácidos grasos (GO:1901568)

Proceso metabólico del colesterol 2,58

(GO:0008203)

Regulación del transporte de 2,55

| | | | |
|---|---|--------------|--|
| | lípidos(GO:0032368) | | |
| Regulación de la polimerización proteica | Homooligomerización de proteínas (GO:0051260) | 4,24 | F2RL1, STK11, SQSTM1, RRM2, |
| | Trimerización de proteínas (GO:0070206) | 4,11 | WIZ, GRB2, SPTBN1, TMOD3, |
| | Homotrimerización de proteínas (GO:0070207) | 6,67 | HSPA8, CFL2, F2RL1, LIMA1, |
| | Heterotrimerización de proteínas (GO:0070208) | 14,29 | GAK, TWF1, ADD1, TRIOBP, CAPZA2, |
| | Heterooligomerización de proteínas (GO:0051291) | 5,66 | CKAP2, USP16, CEP57, CRTC3, |
| | Despolimerización de proteínas (GO:0051261) | 5,38 | KCND3, KCNA7, KCNB1, ATG16L1, |
| | Regulación positiva de la despolimerización de proteínas (GO:1901881) | 7,41 | CAV1, CCDC88C, SOD2, TNFAIP1, SKIL, ATL3, CPT1A, |
| | Regulación negativa de la despolimerización de proteínas (GO:1901880) | 5,33 | SLC6A4, DNM1L, SKI, TYSND1, PRNP, NACC2, |
| | Tetramerización de proteínas (GO:0051262) | 3,63 | BCL2L11, SNX9, SH3GLB1, CCL5, |
| | Regulación de la polimerización de proteínas (GO:0032271) | 3,63 | UXS1, ICAM1, ARPC2, ABI2, |
| | Regulación de la despolimerización de proteínas (GO:1901879) | 5,68 | SLAIN2, AP1AR, ACTR2, GRB2. |

| | | | |
|-----------------------------------|--|--------------|--|
| | Regulación positiva de la oligomerización de proteínas (GO:0032461) | 4,76 | |
| | Regulación de la oligomerización de proteínas (GO:0032459) | 4,44 | |
| | Regulación negativa de la polimerización de proteínas (GO:0032272) | 3,97 | |
| | Regulación positiva de la polimerización de proteínas (GO:0032273) | 3,85 | |
| | Homotetramerización de proteínas (GO:0051289) | 3,74 | |
| Regulación de fibroblastos | Regulación positiva de la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0045743) | 13,33 | E2F1, CTC1, SOD2, JUN, SKI, TRIM32, ZMIZ1, MYCARHGEF7, |
| | Regulación positiva de la migración de fibroblastos (GO:0010763) | 11,11 | GNA12, TGFB1 ,SGPL1, MYC, BCL2L11, STK17B, |
| | Regulación positiva de la proliferación de fibroblastos (GO:0048146) | 9,88 | MDM2, CDKN1A, CEP57, TNRC6B, TNRC6A, PDPK1, |
| | Regulación positiva del proceso apoptótico de fibroblastos (GO:2000271) | 8,70 | PDGFB, CPS1, TCF7L2, NR4A1, CREB1, PHLPP2, |

| | | |
|--|------|-----------------------------|
| Regulación de la proliferación de fibroblastos (GO:0048145) | 8,15 | MAPK1, DSTYK, THEM4, CCL5, |
| Migración de fibroblastos(GO:0010761) | 8,00 | CD28, EREG, PRKACB, PIK3R2, |
| Proliferación de fibroblastos (GO:0048144) | 7,97 | GAB1, KLB, FRS2, UBC, AGO1, |
| Proceso de apoptosis de fibroblastos (GO:0044346) | 7,89 | SHOC2, PTEN, PRKAR1A, GRB2, |
| Regulación negativa de la proliferación de fibroblastos (GO:0048147) | 7,55 | RPS27A. |
| Regulación de la migración de fibroblastos(GO:0010762) | 7,14 | |
| Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0008543) | 6,29 | |
| Respuesta celular al estímulo del factor de crecimiento de los fibroblastos (GO:0044344) | 6,13 | |
| Respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0071774) | 6,09 | |
| Regulación de la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0040036) | 5,36 | |

| | | | |
|---------------------------------|---|--------------|---|
| Regulación de leucocitos | Desgranulación de leucocitos (GO:0043299) | 6,67 | IRF1, CYLD, CREB1, CD46, FAM213A, |
| | Regulación positiva de la desgranulación leucocitaria (GO:0043302) | 12,50 | ITPKB, SOCS5, KLF10, TGFB1, TGFB2, GNAS, |
| | Regulación de la desgranulación leucocitaria (GO:0043300) | 7,14 | RB1, JUN, GLI3, TMEM64, MYC, |
| | Regulación de la diferenciación leucocitaria (GO:1902105) | 4,11 | HMGB3, ACIN1, PRNP, TNFRSF21, |
| | Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria (GO:1902107) | 4,98 | MYH9, PAFAH1B1, VEGFA, OSTM1, GLO1, PDPK1, |
| | Regulación negativa de la diferenciación leucocitaria (GO:1902106) | 4,14 | ICAM1, F2RL1, CD28, WHSC1, B2M, PVR, AP1G1, |
| | Diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002573) | 4,82 | HLA-F, TUSC2, MYO1F, YWHAZ, |
| | Regulación de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002761) | 4,74 | VAMP7, LYST, PTGER4, RORA, TLR7, HMGB1, |
| | Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002763) | 7,61 | CERCAM, ITGB1, HAS2, SKIL, MYO9B, PDGFB, |
| | Regulación de la inmunidad mediada por leucocitos (GO:0002703) | 3,10 | CCL5, ITGA2, RNF19B, BTN3A1, IGF2, CDKN1A, |

| | | |
|---|------|---------------------------------------|
| Regulación positiva de la inmunidad mediada por leucocitos (GO:0002705) | 2,67 | GPAM, HIF1A, TRAF3IP2, PTEN, BCL2L11. |
| Inmunidad mediada por leucocitos mieloides (GO:0002444) | 6,80 | |
| Activación leucocitaria implicada en la respuesta inmune (GO:0002366) | 4,64 | |
| Activación leucocitaria mioide (GO:0002274) | 4,60 | |
| Regulación negativa de la activación leucocitaria (GO:0002695) | 3,40 | |
| Homeostasis de los leucocitos (GO:0001776) | 4,63 | |
| Proceso apoptótico de leucocitos (GO:0071887) | 4,44 | |
| Adhesión de célula-célula de leucocitos (GO:0007159) | 4,07 | |
| Citotoxicidad mediada por leucocitos (GO:0001909) | 3,75 | |
| Regulación positiva de la migración de leucocitos (GO:0002687) | 3,42 | |
| Quimiotaxis de leucocitos | 2,49 | |

| | | | |
|--|--|--------------|---|
| | (GO:0030595) | | |
| | Regulación positiva de la citotoxicidad mediada por leucocitos (GO:0001912) | 3,29 | |
| | Regulación de la citotoxicidad mediada por leucocitos (GO:0001910) | 3,13 | |
| | Regulación negativa del proceso apoptótico de leucocitos (GO:2000107) | 4,11 | |
| | Proliferación de leucocitos (GO:0070661) | 2,48 | |
| | Regulación de la proliferación de leucocitos (GO:0070663) | 2,63 | |
| | Regulación positiva de la proliferación de leucocitos (GO:0070665) | 2,56 | |
| | Regulación de la migración de leucocitos (GO:0002685) | 2,96 | |
| | Regulación del proceso apoptótico de leucocitos (GO:2000106) | 2,88 | |
| Regulación de la respuesta inmune | Diversificación somática de los receptores inmunes a través de mutación somática (GO:0002566) | 12,50 | PTGER4, PDPK1, RORA, MYO1F, ICAM1, YWHAZ, F2RL1, CD46, |

| | | |
|--|------|---|
| Diversificación somática de los receptores inmunes (GO:0002200) | 8,74 | CD28, SOCS5, VAMP7, TGFB1, WHSC1, AP1G1, |
| Diversificación somática de los receptores inmunes a través de la recombinación de la línea germinal dentro de un único locus (GO:0002562) | 6,98 | IRF1, CYLD, MICB, ITCH, GLI3, TSPAN6, HMGB3, PRNP, TNFRSF21, PCBP2, ADAR, |
| Activación de células mieloides involucradas en la respuesta inmune (GO:0002275) | 5,10 | HMGB1, HMGB2, MSH3, NUGGC, POLM, TRAF3IP2, |
| Activación celular implicada en la respuesta inmune (GO:0002263) | 4,64 | B2M, SEMA7A, PVR, WASL, |
| Regulación negativa del proceso efector inmunológico (GO:0002698) | 4,41 | MAPK1, ARPC2, PIK3R2, CRK, WIPF2, ACTR2, |
| Producción de mediadores moleculares de respuesta inmune (GO:0002440) | 3,96 | GRB2, HLA-F, CTSS, CD47, CLOCK, ITGA2, TLR7, IER3, |
| Regulación positiva del proceso efector inmunológico (GO:0002699) | 3,82 | FEM1A, PTGIS. |
| Regulación de la producción de mediador molecular de la respuesta inmune (GO:0002700) | 3,62 | |
| Respuesta inmune-reguladora de | 3,62 | |

| | | | |
|-----------------------------------|--|--------------|------------------------------------|
| | la superficie celular de señalización de la vía de acceso que participan en la fagocitosis (GO:0002433) | | |
| | Regulación negativa del proceso del sistema inmunológico (GO:0002683) | 3,43 | |
| | Regulación de la respuesta inmune adaptativa (GO:0002819) | 2,93 | |
| | Regulación positiva de la respuesta inflamatoria (GO:0050729) | 4,05 | |
| | Regulación negativa de la respuesta inflamatoria (GO:0050728) | 3,38 | |
| Regulación hepática | Diferenciación de hepatocitos (GO:0070365) | 11,76 | ICMT, CPS1, CCND1, SOD2, |
| | Desarrollo del hígado (GO:0001889) | 6,71 | ALDH9A1, GAK, JUN, ITGA2, PKD2, |
| | Desarrollo del sistema hepatobiliar (GO:0061008) | 6,58 | GATA6 |
| regulación de glúcidos | Regulación positiva de la gluconeogénesis (GO:0045722) | 11,54 | MELK, IGF2, PDGFB, CPS1, |
| | Regulación de la actividad glucoquinasa (GO:0033131) | 11,11 | TCF7L2, DYRK2, MAPK9, CERCAM, |
| | Regulación de la gluconeogénesis | 7,69 | DAPK3, MKNK2, |

| | | |
|-------------------------------------|------|--------------------|
| (GO:0006111) | | TGFB1, PPP1R3B, |
| Respuesta a la glucosa | 7,18 | NUAK1, UBC, |
| (GO:0009749) | | RPS6KA5, |
| Regulación de la secreción de | 6,90 | MAPKAPK5, PYGL, |
| insulina implicada en la respuesta | | HAS2, RPS27A, |
| celular al estímulo de la glucosa | | ULK1, PRKCI, |
| (GO:0061178) | | PRKCB, PEA15, |
| Respuesta a la hexosa | 6,80 | NUP98, NUPL1, |
| (GO:0009746) | | RTN2, HK1, |
| Regulación del proceso | 6,70 | SLC2A4, NUP35, |
| metabólico de la glucosa | | M6PR, NUP107, |
| (GO:0010906) | | NUP188, NUP153, |
| Regulación positiva del proceso | 6,67 | NUP205, PFKFB2, |
| metabólico de la glucosa | | SESN2, ICAM1, |
| (GO:0010907) | | SOX4, TGFB2, |
| Proceso catabólico de glucógeno | 6,25 | HIF1A, SYBU, |
| (GO:0005980) | | GPAM, BIRC5, |
| Secreción de insulina implicada | 6,25 | PTEN, TXNIP, |
| en la respuesta celular al estímulo | | EIF2B2, STK11, |
| de la glucosa (GO:0035773) | | KAT2B, SIK1, |
| Proceso catabólico del glucano | 6,00 | PRKACB, PGAM1, |
| (GO:0009251) | | GAPDH, FUT10, |
| Homeostasis de la glucosa celular | 5,97 | IER3, STAT3, PFKP, |
| (GO:0001678) | | SESN3, CRY2, |
| Proceso de biosíntesis de | 5,86 | PDE3B, XBP1, |
| polisacáridos (GO:0000271) | | MIDN, PGM2L1, |

| | | |
|---|------|--------------------|
| Proceso catabólico del polisacárido celular (GO:0044247) | 5,77 | RORA, CPT1A, PDHB. |
| Regulación del transporte de glucosa (GO:0010827) | 5,73 | |
| Homeostasis de carbohidratos (GO:0033500) | 5,71 | |
| Homeostasis de la glucosa (GO:0042593) | 5,71 | |
| Regulación del proceso de biosíntesis de polisacáridos (GO:0032885) | 5,68 | |
| Transporte de hexosa (GO:0008645) | 5,58 | |
| Proceso metabólico polisacárido (GO:0005976) | 5,54 | |
| Proceso de biosíntesis de polisacáridos celulares (GO:0033692) | 5,43 | |
| Proceso metabólico de polisacáridos celulares (GO:0044264) | 5,37 | |
| Respuesta celular al estímulo de la glucosa (GO:0071333) | 5,31 | |
| Regulación del proceso metabólico de polisacáridos (GO:0032881) | 5,26 | |

| | |
|---------------------------------------|------|
| Transporte de glucosa (GO:0015758) | 5,24 |
|---------------------------------------|------|

| | |
|---|------|
| Respuesta celular al estímulo de hexosa (GO:0071331) | 5,00 |
|---|------|

| | |
|---|------|
| Proceso catabólico de polisacáridos (GO:0000272) | 4,92 |
|---|------|

| | |
|------------------------------|------|
| Gluconeogénesis (GO:0006094) | 4,65 |
|------------------------------|------|

| | |
|--|------|
| Proceso metabólico de glucógeno(GO:0005977) | 4,35 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Proceso metabólico de la glucosa (GO:0006006) | 4,30 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Proceso de biosíntesis de hexosa (GO:0019319) | 4,21 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Regulación del proceso biosintético de glucógeno(GO:0005979) | 4,00 |
|--|------|

| | |
|---|------|
| Proceso de biosíntesis de monosacáridos (GO:0046364) | 3,98 |
|---|------|

| | |
|---|------|
| Proceso de biosíntesis de glucógeno (GO:0005978) | 3,79 |
|---|------|

| | |
|---|------|
| Proceso de biosíntesis de glucano (GO:0009250) | 3,79 |
|---|------|

| | |
|--|------|
| Importación de glucosa (GO:0046323) | 3,73 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Regulación del proceso metabólico del glucógeno | 3,66 |
|--|------|

| | | | |
|------------------------------------|--|--------------|--|
| | (GO:0070873) | | |
| | Proceso catabólico de carbohidratos (GO:0016052) | 2,80 | |
| Regulación de células B | Proceso apoptótico de células B (GO:0001783) | 11,43 | CDKN1A, PRKCB, CD28, TGFB1, |
| | Regulación de la inmunidad mediada por células B (GO:0002712) | 5,26 | WHSC1, KLF6, ITGB1, HMGB3, FZD9, TXLNA, |
| | Regulación positiva de la activación de células B (GO:0050871) | 4,04 | POLM, TNFRSF21, TRAF3IP2, PTEN, BCL2L11. |
| | La activación de células B involucrada en la respuesta inmune (GO:0002312) | 3,85 | |
| | Regulación de la activación de células B (GO:0050864) | 3,51 | |
| | Activación de células B (GO:0042113) | 3,18 | |
| | Diferenciación de células B (GO:0030183) | 2,76 | |
| autofagia | Regulación positiva de macroautofagia (GO:0016239) | 11,43 | MFN2, SESN2, FNBP1L, TBC1D17, |
| | Regulación positiva de autofagia (GO:0010508) | 9,59 | STK11, ATG16L1, MARK2, SQSTM1, |
| | Regulación de la macroautofagia (GO:0016241) | 5,97 | DAPK3, SH3BP4, ACBD5, RAB12, |

| | | | |
|-------------------------------------|---|--------------|--|
| | Macroautofagia (GO:0016236) | 5,06 | WAC, TOLLIP, |
| | Autofagia (GO:0006914) | 4,34 | TP53INP1, ATG2B, |
| | Regulación de la autofagia (GO:0010506) | 3,60 | ATG2A, ATG14, ULK1, ATG16L1. |
| Regulación de linfocitos | Diferenciación de linfocitos (GO:0030098) | 4,67 | IRF1, CYLD, TUSC2, PTGER4, RORA, |
| | Regulación de la diferenciación linfocitaria (GO:0045619) | 3,25 | STK11, PKNOX1, MINK1, CD46, |
| | Regulación positiva de la diferenciación linfocitaria (GO:0045621) | 3,25 | CD28, ITPKB, SOCS5, SOX4, TGFB1, B2M, |
| | Regulación negativa de la diferenciación linfocitaria (GO:0045620) | 10,00 | TGFBR2, GLI3, KLF6, TXK, ITGB1, HMGB3, FZD9, |
| | Proceso linfocitario apoptótico (GO:0070227) | 6,84 | POLM, CCL5, HIF1A, GPAM, |
| | Regulación del proceso linfocitario apoptótico (GO:0070228) | 4,49 | TRAF3IP2, PTEN, SKIL, BCL2L11, ICAM1, F2RL1, |
| | Regulación negativa del proceso apoptótico linfocitario (GO:0070229) | 6,98 | WHSC1, AP1G1, IGF2, CDKN1A, PVR, HLA-F, |
| | Homeostasis de linfocitos (GO:0002260) | 5,75 | BTN3A1, PRNP, TNFRSF21, |
| | Activación de linfocitos implicados en la respuesta | 4,85 | MAP3K14, PDPK1, CAV1, GRB2. |

| | | | |
|--|--|-------------|---|
| | inmune (GO:0002285) | | |
| | Regulación de la inmunidad mediada por linfocitos (GO:0002706) | 2,54 | |
| | Regulación negativa de la activación de linfocitos (GO:0051250) | 4,10 | |
| | Proliferación de linfocitos (GO:0046651) | 2,41 | |
| | Regulación de la proliferación de linfocitos (GO:0050670) | 2,74 | |
| | Regulación positiva de la proliferación de linfocitos (GO:0050671) | 2,68 | |
| | Coestimulación de linfocitos (GO:0031294) | 2,31 | |
| Silenciamien to génico por miRNAs | Regulación negativa de la traducción implicada en el silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035278) | 9,52 | CNOT7, TNRC6B, TNRC6A, MECP2, ASF1A, DNMT3B, SND1, PIWIL2, |
| | Silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035195) | 3,92 | BAZ2A, ADAR, AGO1, KMT2D, |
| | Silenciamiento génico posttranscripcional por RNA (GO:0035194) | 3,48 | KMT2B, CNOT6L. |
| | Silenciamiento génico | 3,48 | |

| | | | |
|------------------------------|---|-------------|----------------------------------|
| | posttranscripcional (GO:0016441) | | |
| | Regulación negativa del silenciamiento génico (GO:0060969) | 6,67 | |
| | Silenciamiento génico (GO:0016458) | 4,93 | |
| | Silenciamiento génico por RNA (GO:0031047) | 4,15 | |
| Regulación de iones | Homeostasis de iones de cobre (GO:0055070) | 9,09 | MDM2, CPOX, CCND1, CYBRD1, |
| | Respuesta al ión hierro(GO:0010039) | 8,00 | SLC30A1, SLC30A7, SFXN5, SOD2, |
| | Homeostasis celular de iones de cobre(GO:0006878) | 7,14 | B2M, ATP6V0E1, HIF1A, MYC, |
| | Homeostasis de iones de transición de metálicos (GO:0055076) | 4,29 | NUBP1, PRNP, FBXL5, APLP2, XIAP. |
| | Homeostasis del hierro (GO:0055072) | 3,73 | |
| | Homeostasis celular de iones de transición metálicos (GO:0046916) | 3,45 | |
| | Homeostasis celular del hierro (GO:0006879) | 2,65 | |
| Regulación de células | Activación de células dendríticas mieloides (GO:0001773) | 7,89 | TGFB1, TGFB2, HMGB1, CCL5 |

| | | | |
|--|--|-------------|--|
| dendríticas | Quimiotaxis de células dendríticas (GO:0002407) | 6,90 | |
| | Diferenciación de células dendríticas mieloides (GO:0043011) | 6,90 | |
| | Activación de granulocitos(GO:0036230) | 8,51 | MYO1F,F2RL1,CCL 5,VAMP7 |
| Regulación del catabolismo de proteínas | Regulación del proceso catabólico de proteínas celulares (GO:1903362) | 4,59 | MDM2, SENP1, DAB2, MYLIP, GNA12, UBE2V2, |
| | Regulación positiva del proceso catabólico de proteínas (GO:0045732) | 5,75 | SOCS5, WAC, N4BP1, FBXL5, MAD2L1, PTEN, |
| | Regulación positiva del proceso catabólico proteasomal de proteínas (GO:1901800) | 6,73 | XBP1, SMAD7, IER3, SNX9, TRIM32, CREBRF. |
| | Regulación del proceso catabólico proteasomal de proteínas (GO:0061136) | 5,41 | |
| | Regulación positiva de la proteólisis implicada en el proceso catabólico proteínas celulares (GO:1903052) | 6,54 | |
| | Regulación negativa del proceso catabólico proteasomal de proteínas (GO:1901799) | 4,76 | |

| | | | |
|---|--|-------------|--------------------------------|
| | Regulación negativa de la proteólisis implicada en el proceso catabólico de proteínas celulares (GO:1903051) | 4,76 | |
| Regulación de receptores tipo toll | Vía de señalización del receptor de tipo toll (GO:0002224) | 2,92 | IRAK4, CREB1, MAPK1, MAPK9, |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 2 (GO:0034134) | 4,04 | JUN, UBC, TLR7, RPS27A, F2RL1, |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 3 (GO:0034138) | 3,07 | TNIP3, IRF1, PDPK1, IRAK4, |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 4 (GO:0034142) | 3,17 | CTSS, CREB1. |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 5 (GO:0034146) | 4,05 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 9 (GO:0034162) | 4,28 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 10 (GO:0034166) | 4,05 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll TLR1:TLR2 (GO:0038123) | 3,74 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll TLR6:TLR2 (GO:0038124) | 3,74 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll MyD88-dependiente | 3,06 | |

| | | | |
|--|--|------|---|
| | (GO:0002755) | | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll MyD88-independiente (GO:0002756) | 3,21 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll TRIF-dependiente (GO:0035666) | 2,80 | |
| Regulación de células mononucleares | Regulación de la proliferación de células mononucleares (GO:0032944) | 2,70 | IRF1, BTN3A1, IGF2, CDKN1A, CCL5, CD46, CD28, |
| | Regulación positiva de la proliferación de células mononucleares (GO:0032946) | 2,61 | TGFB1, GPAM, PRNP, TNFRSF21. |
| | Proliferación celular mononuclear (GO:0032943) | 2,37 | |
| | | | |

Tabla S 4. Funciones inhibidas por los miR-106a y 17.

| Función general | Función específica | % inhibición | genes inhibidos |
|-----------------------------|---|--------------|--|
| Respuesta a lesiones | Cicatrización de heridas involucrada en la respuesta inflamatoria (GO:0002246) | 50,00 | TGFB1, HIF1A, ASH1L, IL10, PTGER4, RORA, |
| | Respuesta inflamatoria a la herida (GO:0090594) | 50,00 | IER3, FEM1A, EPHA4, PTGIS, F3, |
| | Regulación negativa de la | 5,33 | PDGFB, F2RL1, |
| | | | |

| | | | |
|------------------------------------|--|--------------|--|
| | respuesta a heridas (GO:1903035) | | THBS1, CAV1, APOH, TGFBR2, |
| | Regulación de la cicatrización de heridas (GO:0061041) | 3,77 | F2R, SMAD3, CTSS, CD47, CD28, |
| | Regulación positiva de la respuesta a las heridas (GO:1903036) | 3,11 | CLOCK, ITGA2, TLR7. |
| Regulación de células B | Compromiso de linaje de células B (GO:0002326) | 50,00 | BCL10, TRAF3IP2, PTEN, NOC2L, |
| | Proceso apoptótico de células B (GO:0001783) | 20,00 | BCL2L11, HIF1A, CDKN1A, IL10, |
| | Regulación del proceso apoptótico de células B (GO:0002902) | 15,38 | PRKCB, CD28, BCL2, TGFB1, WHSC1, VPRBP, |
| | Regulación negativa del proceso apoptótico de células B (GO:0002903) | 12,50 | PELI1, ATM, TCF3, FAS, KLF6, TP53, ITGB1, HMGB3, |
| | Regulación de la proliferación de células B (GO:0030888) | 6,36 | FZD9, TXLNA, POLM, TNFRSF21. |
| | Regulación negativa de la proliferación de células B (GO:0030889) | 12,00 | |
| | Regulación positiva de la proliferación de células B (GO:0030890) | 6,25 | |
| | Homeostasis de células B | 10,81 | |

| | | | |
|------------------------------------|--|-------|-----------------------------|
| | (GO:0001782) | | |
| | Regulación de la activación de células B (GO:0050864) | 7,19 | |
| | La activación de células B (GO:0042113) | 5,39 | |
| | La activación de células B implicada en la respuesta inmune (GO:0002312) | 5,13 | |
| | Regulación positiva de la activación de células B (GO:0050871) | 7,29 | |
| | Regulación negativa de la activación de células B (GO:0050869) | 10,64 | |
| | Regulación de la inmunidad mediada por células B (GO:0002712) | 7,02 | |
| | Diferenciación de células B (GO:0030183) | 6,21 | |
| | Proliferación de células B (GO:0042100) | 4,52 | |
| Respuesta a microorganismos | Respuesta al huésped (GO:0075136) | 14,29 | MICB, ITCH, IFNAR1, ILF3, |
| | Respuesta a las defensas del huésped (GO:0052200) | 14,29 | ADARB1, KCNJ8, CRCP, F2RL1, |
| | Regulación negativa de la | 5,37 | CD28, BCL2, B2M, |

| | | |
|--|--------------|------------------|
| respuesta defensa (GO:0031348) | | POLR3G, POLR3F, |
| Evitar las defensas del huésped | 25,00 | POLR3A, GPAM, |
| (GO:0044413) | | TSPAN6, ADAR, |
| Evasión o tolerancia de las | 25,00 | TLR7, TRIM11, |
| defensas del huésped | | MAVS, RNF216, |
| (GO:0044415) | | LSM14A, AP1G1, |
| Evasión o tolerancia de las | 40,00 | PCBP2, ASH1L, |
| defensas del huésped por virus | | IL10, PTGER4, |
| (GO:0019049) | | RORA, IER3, |
| Modulación del proceso de | 12,50 | FEM1A, PTGIS, |
| acogida por virus (GO:0019054) | | SMAD3, REST, |
| Regulación negativa de la | 12,50 | CCL5, TGFB1, |
| respuesta de la defensa al virus | | BCL2L11, TRIM32, |
| (GO:0050687) | | TRIM8. |
| Regulación negativa por huésped | 7,41 | |
| de la transcripción viral | | |
| (GO:0043922) | | |
| Modulación de morfología o | 7,14 | |
| fisiología del huésped por virus | | |
| (GO:0019048) | | |
| Respuesta de defensa al virus | 5,49 | |
| (GO:0051607) | | |
| Regulación de la respuesta de la | 5,36 | |
| defensa al virus por el anfitrión | | |
| (GO:0050691) | | |
| Regulación de la respuesta de | 4,92 | |

defensa al virus (GO:0050688)

Regulación de la respuesta de 3,95

defensa al virus por virus

(GO:0050690)

Regulación de la liberación viral 3,41

de la célula huésped

(GO:1902186)

Regulación positiva de la muerte 25,00

de células de otro organismo

(GO:0051712)

Evasión o tolerancia de las 25,00

defensas de otro organismo

implicado en la interacción

simbiótica (GO:0051834)

Evitación de defensas de otro 25,00

organismo implicado en la

interacción simbiótica

(GO:0051832)

Respuesta a las defensas de otro 14,29

organismo implicado en la

interacción simbiótica

(GO:0052173)

Muerte de células en otro 14,29

organismo implicado en la

interacción simbiótica

(GO:0051883)

| | | | |
|---------------------------------------|--|--------------|--|
| | Modulación por simbiote del proceso celular del huésped (GO:0044068) | 6,90 | |
| | Modificación de la morfología o fisiología del huésped por el simbiote (GO:0044003) | 5,00 | |
| | Modificación por el hospedador de la morfología del simbiote o fisiología (GO:0051851) | 4,84 | |
| | Regulación negativa de la liberación viral de la célula huésped (GO:1902187) | 4,35 | |
| Regulación antígeno-anticuerpo | Inducción de tolerancia al antígeno propio (GO:0002513) | 40,00 | BCL10, BTN3A1, PDPK1, PRKCB, |
| | Respuesta inflamatoria al estímulo antigénico (GO:0002437) | 9,62 | STK11, MAPK1, CD28, BCL2, PIK3CA, TXK, UBC, |
| | Regulación de la respuesta inflamatoria al estímulo antigénico (GO:0002861) | 8,70 | PRNP, PTEN, TNFRSF21, RPS27A, CLU, |
| | Regulación de la vía de señalización mediada por receptor de antígeno (GO:0050854) | 4,62 | TGFB1, TGFB2, SOCS5, WHSC1, B2M, PVR, RACGAP1, |
| | Vía de señalización mediada por receptor de antígeno | 3,96 | DYNC1LI2, CTSS, CANX, SEC23A, |

| | | |
|--|--------------|---|
| (GO:0050851) | | DCTN5, DCTN6, |
| Regulación positiva del cambio de isotipo a isotipos de IgA (GO:0048298) | 33,33 | AP1G1, KIF23, IL10, ICAM1, NOTCH2, HMGB1. |
| Regulación del cambio de isotipo a isotipos de IgA (GO:0048296) | 28,57 | |
| Cambio de isotipo a isotipos de IgA (GO:0048290) | 28,57 | |
| Regulación de la respuesta inmune mediada por inmunoglobulina (GO:0002889) | 7,27 | |
| Diversificación somática de las inmunoglobulinas implicadas en la respuesta inmune (GO:0002208) | 6,67 | |
| Recombinación somática de los genes de la inmunoglobulina implicados en la respuesta inmune (GO:0002204) | 6,67 | |
| Inmunoglobulina implicada en la respuesta inmune mediada por inmunoglobulina (GO:0002381) | 4,88 | |
| El procesamiento del antígeno y la presentación del antígeno peptídico exógeno vía MHC clase II (GO:0019886) | 3,07 | |

| | | | |
|-------------------------------------|---|--------------|------------------------------------|
| | El procesamiento del antígeno y la presentación del antígeno peptídico vía MHC de clase II (GO:0002495) | 2,98 | |
| | Respuesta inmune mediada por inmunoglobulina (GO:0016064) | 2,59 | |
| | Regulación de la respuesta inmune adaptativa basada en la recombinación somática de receptores inmunes contruidos a partir de dominios de superfamilia de inmunoglobulinas (GO:0002822) | 2,58 | |
| Regulación de glucoproteínas | Regulación de la glicosilación de proteínas (GO:0060049) | 18,75 | TCF7L2, KAT2B, BCL2, ACER2, MGEA5. |
| | Regulación negativa de la glicosilación de proteínas (GO:0060051) | 40,00 | |
| | Regulación del proceso metabólico de la glucoproteína (GO:1903018) | 8,62 | |
| | Regulación negativa del proceso biosintético de la glicoproteína (GO:0010561) | 10,53 | |
| | Regulación negativa del proceso metabólico de la glucoproteína | 8,33 | |

| | | | |
|---|---|--------------|---|
| | (GO:1903019) | | |
| | Regulación del proceso biosintético de la glicoproteína | 10,20 | |
| | (GO:0010559) | | |
| Regulación de receptores tipo toll | Vía de señalización del receptor de tipo toll (GO:0002224) | 3,39 | BCL10, PDPK1, IRAK4, IRAK1, |
| | Regulación positiva de la vía de señalización del receptor de tipo toll 3 (GO:0034141) | 33,33 | CTSS, CREB1, MAPK1, MAPK9, F2RL1, PELI1, UBC, |
| | Regulación de la vía de señalización del receptor de tipo toll 3 (GO:0034139) | 25,00 | TLR7, MAPK14, TNIP3, RPS27A. |
| | Regulación positiva de la vía de señalización del receptor de tipo toll 4 (GO:0034145) | 13,33 | |
| | Regulación de la vía de señalización del receptor de tipo toll 4 (GO:0034143) | 7,14 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 9 (GO:0034162) | 5,46 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 10 (GO:0034166) | 5,33 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 5 (GO:0034146) | 5,33 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 2 (GO:0034134) | 5,15 | |
| | | | |

| | | | |
|---------------------------------|--|--------------|--|
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll TLR1:TLR2 (GO:0038123) | 4,92 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll TLR6:TLR2 (GO:0038124) | 4,92 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 3 (GO:0034138) | 4,02 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll 4 (GO:0034142) | 3,93 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll MyD88-independiente (GO:0002756) | 3,74 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll MyD88-dependiente (GO:0002755) | 3,44 | |
| | Vía de señalización del receptor de tipo toll TRIF-dependiente (GO:0035666) | 3,33 | |
| Regulación de citoquinas | Proceso de biosíntesis de interferón-alfa (GO:0045349) | 28,57 | CYLD, ITCH, IFNAR1, IL10, |
| | Regulación del proceso de biosíntesis de interferón-alfa (GO:0045354) | 28,57 | POLR3G, POLR3F, POLR3A, UBC, TLR7, TRIM32, |
| | Proceso de biosíntesis de interferón tipo I (GO:0045351) | 20,00 | TAX1BP1, MAVS, RNF216, PCBP2, |

| | | |
|--|-------|--|
| Respuesta al interferón-alfa (GO:0035455) | 11,11 | RPS27A, BTN3A1, BTN3A2, IF2RL1, |
| Producción de interferón alfa (GO:0032607) | 7,14 | RUNX3, TXK, PRNP, RNF19B, |
| Regulación de la producción de interferón-alfa (GO:0032647) | 7,32 | IFNAR2, JAK1, ADAR, LSM14A, |
| Secreción de interferón gamma (GO:0072643) | 16,67 | KLHL20, PTGER4, ABCA1, NOTCH2, |
| Producción de interferón gamma (GO:0032609) | 6,33 | F2R, GPAM, SCAMP5, |
| Regulación de la producción de interferón gamma (GO:0032649) | 3,62 | TNFRSF21, IRAK1, PAFAH1B1, F2RL1, |
| Regulación positiva de la vía de señalización mediada por interferón tipo I (GO:0060340) | 15,38 | CCL5, CAV1, HIF1A, TGFB1, SEMA7A, THBS1, |
| Regulación de la vía de señalización mediada por interferón tipo I (GO:0060338) | 9,68 | GATA6, BCL10, CD28, ASB1, CLU, |
| Regulación negativa de la producción de interferón tipo I (GO:0032480) | 7,14 | |
| Producción de interferón tipo I (GO:0032606) | 5,42 | |
| Regulación de la producción de interferón tipo I (GO:0032479) | 5,13 | |
| Regulación positiva de la | 3,54 | |

producción de interferón tipo I
(GO:0032481)

Regulación positiva de la 7,69

producción de interferón-beta
(GO:0032728)

Regulación de la producción de 7,59
interferón-beta (GO:0032648)

Regulación positiva de la 11,11
producción de citoquinas de
leucocitos mieloides implicada en
la respuesta inmune
(GO:0061081)

Producción de citoquinas de 10,00
leucocitos mieloides
(GO:0061082)

Regulación de la secreción de 8,33
citoquinas implicada en la
respuesta inmune (GO:0002739)

Secreción de citoquinas implicada 8,00
en la respuesta inmune
(GO:0002374)

Regulación positiva de la vía de 5,88
señalización mediada por
citoquinas (GO:0001961)

Regulación positiva de la 5,49
respuesta al estímulo de

citoquinas (GO:0060760)

| | |
|-------------------------|------|
| Regulación de la vía de | 5,39 |
|-------------------------|------|

señalización mediada por

citoquinas (GO:0001959)

| | |
|--------------------------------|------|
| Regulación de la producción de | 5,38 |
|--------------------------------|------|

citocinas implicada en la

respuesta inmune (GO:0002718)

| | |
|-------------------------------|------|
| Regulación de la respuesta al | 4,98 |
|-------------------------------|------|

estímulo de las citoquinas

(GO:0060759)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación negativa de la | 4,94 |
|---------------------------|------|

secreción de citoquinas

(GO:0050710)

| | |
|----------------------------------|------|
| Regulación negativa de la vía de | 4,49 |
|----------------------------------|------|

señalización mediada por

citoquinas (GO:0001960)

| | |
|-------------------------|------|
| Secreción de citoquinas | 4,33 |
|-------------------------|------|

(GO:0050663)

| | |
|--------------------------|------|
| Producción de citoquinas | 4,67 |
|--------------------------|------|

implicadas en la respuesta

inmune (GO:0002367)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación negativa de la | 4,04 |
|---------------------------|------|

respuesta al estímulo de

citoquinas (GO:0060761)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación negativa de la | 3,88 |
|---------------------------|------|

producción de citoquinas

| | | | |
|--|---|--------------|-------------------------------|
| | (GO:0001818) | | |
| | Proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042089) | 3,70 | |
| | Regulación positiva del proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042108) | 3,64 | |
| | Proceso metabólico de las citoquinas (GO:0042107) | 3,63 | |
| | Regulación del proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042035) | 3,45 | |
| | Regulación positiva de la secreción de citoquinas (GO:0050715) | 3,37 | |
| | Producción de la superfamilia de citoquinas factor de necrosis tumoral (GO:0071706) | 2,99 | |
| | Regulación de la secreción de citoquinas (GO:0050707) | 2,99 | |
| Regulación del aparato respiratorio | Diferenciación de células pulmonares (GO:0060479) | 8,82 | VEGFA, NFIB, CREB1, CRISPLD2, |
| | Diferenciación de neumocitos tipo II (GO:0060510) | 28,57 | TGFBR2, PPP1CA, GATA6, EPAS1, |
| | Diferenciación de neumocitos tipo I (GO:0060509) | 25,00 | ATXN1, BMPR2, HECA, SKI, |
| | Diferenciación celular secretor | 14,29 | PTGER4, CTSS, |

| | | | |
|-----------------------------|---|--------------|------------------------------|
| | pulmonar (GO:0061140) | | CD47, CD28, |
| | Desarrollo del pulmón (GO:0060430) | 11,76 | CLOCK, ITGA2, |
| | Diferenciación de células epiteliales pulmonares (GO:0060487) | 10,00 | TLR7, CAV1, SOD2, |
| | Desarrollo del alveolo pulmonar (GO:0048286) | 5,48 | HIF1A, MECP2, |
| | Desarrollo del epitelio pulmonar (GO:0060428) | 4,35 | SLC5A3. |
| | Desarrollo pulmonar (GO:0030324) | 3,64 | |
| | Desarrollo de tubo respiratorio (GO:0030323) | 3,93 | |
| | Regulación positiva de la respuesta pulmonar (GO:0050729) | 4,05 | |
| | Desarrollo del sistema respiratorio (GO:0060541) | 3,50 | |
| | Homeostasis del gas (GO:0033483) | 23,08 | |
| | Regulación del intercambio gaseoso respiratorio (GO:0043576) | 7,14 | |
| Regulación de NK | Diferenciación de células T NK (GO:0001865) | 28,57 | TGFBR2, TXK, TUBB4B, PVR, |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|---|
| | Citotoxicidad mediada por células natural killer (GO:0042267) | 2,99 | RNF19B, AP1G1, BLOC1S3. |
| | Inmunidad mediada por células natural killer (GO:0002228) | 2,96 | |
| | Regulación positiva de la activación de células natural killer (GO:0032816) | 7,69 | |
| | Regulación de la activación de células natural killer (GO:0032814) | 6,25 | |
| Regulación de células T | Selección de células T (GO:0045058) | 11,32 | BCL10, CCL5, HIF1A, GPAM, |
| | Selección de células del timo T(GO:0045061) | 18,52 | BCL2L11, CYLD, PTGER4, RORA, |
| | Selección de las células T negativas (GO:0043383) | 20,00 | STK11, PKNOX1, MINK1, CD28, |
| | Selección de las células T del timo negativas (GO:0045060) | 25,00 | ITPKB, SOCS5, BCL2, SOX4, |
| | Selección de células T positivas (GO:0043368) | 8,33 | TGFB1, B2M, TCF3, TGFB2, FAS, TXK, |
| | Selección positiva de células T del timo (GO:0045059) | 12,50 | TP53, CLPTM1, IL10, SOCS6, PELI1, |
| | Muerte celular inducida por activación de células T (GO:0006924) | 11,11 | PRNP, TNFRSF21, ICAM1, F2RL, BTN3A1, PDPK1, |
| | Regulación negativa del proceso | 10,71 | MAPK1, PIK3CA, |

| | | |
|---|-------|---------------------------------|
| apoptótico de las células T (GO:0070233) | | UBC, PTEN, RPS27A, |
| Proceso apoptótico de células T (GO:0070231) | 9,09 | MAP3K14, CAV1, YES1, MAP3K8. |
| Regulación positiva del proceso apoptótico de las células T (GO:0070234) | 8,33 | |
| Regulación del proceso apoptótico de células T (GO:0070232) | 7,41 | |
| Compromiso del linaje de células T (GO:0002360) | 10,00 | |
| Diferenciación de las células T en el timo (GO:0033077) | 9,52 | |
| Diferenciación de células T (GO:0030217) | 5,52 | |
| Diferenciación de células T alfa- beta (GO:0046632) | 5,74 | |
| Diferenciación de las células T alfa-beta implicada en la respuesta inmune (GO:0002293) | 3,61 | |
| Regulación de la diferenciación de las células T alfa-beta (GO:0046637) | 3,85 | |
| Diferenciación de las células T alfa-beta CD4-positiva implicada | 3,75 | |

en la respuesta inmune

(GO:0002294)

| | |
|------------------------------|------|
| Homeostasis de las células T | 8,93 |
|------------------------------|------|

(GO:0043029)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación negativa de la | 5,56 |
|---------------------------|------|

activación de células T

(GO:0050868)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación negativa de la | 5,10 |
|---------------------------|------|

proliferación de células T

(GO:0042130)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación positiva de la | 5,08 |
|---------------------------|------|

diferenciación de células T alfa-

beta (GO:0046638)

| | |
|-----------------------------------|------|
| Activación de células T alfa-beta | 4,88 |
|-----------------------------------|------|

(GO:0046631)

| | |
|-----------------------------------|------|
| Activación de células T implicada | 4,35 |
|-----------------------------------|------|

en la respuesta inmune

(GO:0002286)

| | |
|-----------------------------------|------|
| Activación de células T alfa-beta | 3,61 |
|-----------------------------------|------|

implicada en la respuesta inmune

(GO:0002287)

| | |
|--------------------------------|------|
| Regulación de la activación de | 3,57 |
|--------------------------------|------|

células T alfa-beta (GO:0046634)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación positiva de la | 4,76 |
|---------------------------|------|

activación de células T alfa-beta

(GO:0046635)

| | | | |
|---------------------------------|---|--------------|--|
| | Camino de señalización del receptor de células T (GO:0050852) | 4,30 | |
| | Proliferación de células T (GO:0042098) | 3,17 | |
| | Proliferación de células T activada (GO:0050798) | 3,95 | |
| | Coestimulación de las células T (GO:0031295) | 3,26 | |
| | Diferenciación de células T-helper (GO:0042093) | 3,75 | |
| Regulación de linfocitos | Proceso apoptótico linfocitario (GO:0070227) | 10,81 | BCL10, IL10, CCL5, FAS, HIF1A, GPAM, |
| | Regulación del proceso apoptótico linfocitario (GO:0070228) | 9,64 | TP53, TRAF3IP2, PTEN, NOC2L, BCL2L11, |
| | Regulación negativa del proceso apoptótico linfocitario (GO:0070229) | 11,63 | TNFRSF21, SKIL, CYLD, PTGER4, RORA, STK11, |
| | Regulación positiva del proceso apoptótico linfocitario (GO:0070230) | 9,68 | PKNOX1, MINK1, CD28, ITPKB, BCL2, SOX4, TGFB1, |
| | Homeostasis de los linfocitos (GO:0002260) | 9,20 | VPRBP, B2M, ATM, TCF3, TGFB2, |
| | Diferenciación de linfocitos (GO:0030098) | 5,43 | KLF6, TXK, ITGB1, HMGB3, FZD9, |

| | | | |
|-----------------------|--|-------|---|
| | Regulación negativa de la diferenciación linfocitaria (GO:0045620) | 5,88 | CLPTM1, POLM, SOCS6, SOCS5, PELI1, PRNP, |
| | Regulación negativa de la activación de los linfocitos (GO:0051250) | 5,64 | ICAM1, F2RL1, WHSC1, AP1G1, BTN3A1, CDKN1A, |
| | Activación de linfocitos implicados en la respuesta inmune (GO:0002285) | 5,12 | MAP3K14, PDPK1, CAV1, PIK3CA, YES1, MAP3K8. |
| | Proliferación de linfocitos (GO:0046651) | 2,99 | |
| | Regulación de la proliferación de linfocitos (GO:0050670) | 3,17 | |
| | Regulación negativa de la proliferación de linfocitos (GO:0050672) | 4,65 | |
| | Coestimulación de linfocitos (GO:0031294) | 3,24 | |
| Muerte celular | Regulación negativa de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1901029) | 28,57 | MCL1, SLC35F6, IER3, E2F1. YWHAZ, MAPK9, THEM4, BCL2, SOD2, DNMT1L, |
| | Regulación de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial implicada en la vía | 7,08 | CLU, PPP3R1, TP53, CASP7, BCL2L11, DDX5, |

| | | |
|---|------|--|
| de señalización apoptótica (GO:1901028) | | STK11, E2F2, RRN3, PLAGL2, |
| Regulación de la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1900739) | 6,98 | TRAP1, MBIM6, NONO, HIF1A, NOC2L, TP53INP1, PTEN, MNT, MGEA5, |
| Regulación positiva de la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:1900740) | 6,98 | TMEM123, MDM2, MEN1, F3, SENP1, VEGFA, REST, EGLN3, GPI, ACER2, F2R, MYC, DNAJB6, HIP1, |
| Inserción de proteínas en la membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica (GO:0001844) | 6,67 | XIAP, SKIL, NACC2, CYCS, HMGB1, HMGB2, USP28, CDKN1A, DYRK2, TAF9B, TOPORS, |
| Regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial implicada en el proceso apoptótico (GO:1902108) | 6,34 | ATM, ZNF385A, TRIM32, BCL2L2, CASP2, PEA15, THBS1, ICAM1, |
| Permeabilización de la membrana externa mitocondrial implicada en la muerte celular programada (GO:1902686) | 5,84 | FEM1B, FAS, RNF34, TNFRSF10B, BCL10, CYLD, |

| | | |
|---|--------------|--|
| Regulación positiva de la permeabilidad de la membrana mitocondrial implicada en el proceso apoptótico (GO:1902110) | 5,84 | PDPK1, PPP2R1A, TCF7L2, DAPK3, CAV1, MKNK2, TGFB1, COL2A1, RUNX3, SGMS1, |
| Cambios mitocondriales apoptóticos (GO:0008637) | 5,84 | HTT, TNFSF12, PPP1CA, ACVR1B, |
| Regulación positiva de la ruta de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA (GO:1902231) | 25,00 | SMAD3, SLC4A7, FOXC1, PTGIS, ADD1, TJP1, CCL5, APOH, PTEN. |
| Fragmentación apoptótica del DNA (GO:0006309) | 7,14 | |
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA (GO:0008630) | 7,12 | |
| Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA (GO:1902230) | 6,06 | |
| Regulación de la vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA (GO:1902229) | 8,11 | |
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño | 4,86 | |

del DNA por el mediador de la
clase p53 (GO:0042771)

Regulación positiva de la vía de 17,65
señalización apoptótica
extrínseca vía receptores de
dominio de muerte (GO:1902043)

Regulación de la vía de 7,78
señalización apoptótica
extrínseca vía receptores de
dominio de muerte (GO:1902041)

Regulación negativa de la vía de 7,02
señalización apoptótica
extrínseca a través de receptores
del dominio de muerte
(GO:1902042)

Vía de señalización apoptótica 5,56
extrínseca vía receptores del
dominio de muerte (GO:0008625)

Regulación positiva de la ruta de 17,39
señalización apoptótica
extrínseca en ausencia de ligando
(GO:2001241)

Vía de señalización apoptótica 6,52
extrínseca en ausencia de ligando
(GO:0097192)

Regulación de la ruta de 5,88

señalización apoptótica
extrínseca en ausencia de ligando
(GO:2001239)

Regulación negativa de la ruta de 3,45

señalización apoptótica
extrínseca en ausencia de ligando
(GO:2001240)

Regulación positiva de la vía de 11,01

señalización apoptótica
extrínseca (GO:2001238)

Regulación de la vía de 6,52

señalización apoptótica
extrínseca (GO:2001236)

Vía de señalización apoptótica 6,44

extrínseca (GO:0097191)

Regulación negativa de la vía de 5,24

señalización apoptótica
extrínseca (GO:2001237)

negative regulation of myeloid 13,64

cell apoptotic
process(GO:0033033)

regulation of myeloid cell 9,30

apoptotic process(GO:0033032)

myeloid cell apoptotic 7,02

process(GO:0033028)

Regulación de la vía de 9,09

señalización apoptótica intrínseca
por el mediador clase p53
(GO:1902253)

Regulación negativa de la vía de 7,50
señalización apoptótica intrínseca
por el mediador de la clase p53
(GO:1902254)

Vía de señalización apoptótica 6,82
intrínseca por el mediador de
clase p53 (GO:0072332)

Regulación positiva de la vía de 8,70
señalización apoptótica intrínseca
(GO:2001244)

Regulación negativa de la vía de 8,54
señalización apoptótica intrínseca
(GO:2001243)

Regulación de la vía de 7,80
señalización apoptótica intrínseca
(GO:2001242)

Regulación positiva de la vía de 8,45
señalización apoptótica
(GO:2001235)

Regulación negativa de la vía de 6,70
señalización apoptótica
(GO:2001234)

Muerte celular necrótica 8,82

(GO:0070265)

| | |
|----------------------|------|
| Proceso necroptótico | 7,55 |
|----------------------|------|

(GO:0070266)

| | |
|--------------------------|------|
| Muerte celular necrótica | 6,56 |
|--------------------------|------|

programada (GO:0097300)

| | |
|----------------------------|------|
| Activación de la actividad | 8,00 |
|----------------------------|------|

endopeptidasa de tipo cisteína

implicada en el proceso

apoptótico por citocromo c

(GO:0008635)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación positiva de la | 6,14 |
|---------------------------|------|

actividad endopeptidasa de tipo

cisteína implicada en el proceso

apoptótico (GO:0043280)

| | |
|----------------------------|------|
| Activación de la actividad | 5,88 |
|----------------------------|------|

endopeptidasa de tipo cisteína

implicada en el proceso

apoptótico (GO:0006919)

| | |
|----------------------------|------|
| Regulación de la actividad | 5,65 |
|----------------------------|------|

endopeptidasa de tipo cisteína

implicada en el proceso

apoptótico (GO:0043281)

| | |
|---------------------------|------|
| Regulación negativa de la | 4,27 |
|---------------------------|------|

actividad endopeptidasa de tipo

cisteína implicada en el proceso

apoptótico (GO:0043154)

| | | | |
|------------------------------------|--|--------------|--|
| | Muerte celular programada por desarrollo (GO:0010623) | 6,94 | |
| | Cambios nucleares apoptóticos (GO:0030262) | 4,17 | |
| | Ejecución de la apoptosis (GO:0097194) | 3,58 | |
| | Desmontaje de componentes celulares implicados en la fase de ejecución de la apoptosis (GO:0006921) | 3,47 | |
| Silenciamiento génico miRNA | Desestabilización del RNAm (GO:0061157) | 25,00 | CNOT7, TNRC6B, TNRC6A, MECP2, |
| | Regulación negativa de la traducción implicada en el silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035278) | 20,00 | DNMT1, PIWIL2, BAZ2A, ADAR, TRIM71, AGO1, AGO3, KMT2B, |
| | Regulación del silenciamiento génico por RNA (GO:0060966) | 8,33 | CNOT6L, SMAD3, QKI, TGFB1. |
| | Regulación del silenciamiento génico posttranscripcional (GO:0060147) | 8,33 | |
| | Proceso metabólico de miRNA (GO:0010586) | 8,11 | |
| | Silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035195) | 7,14 | |
| | Silenciamiento génico | 6,31 | |

| | | | |
|-------------------------|--|--------------|--|
| | posttranscripcional por RNA (GO:0035194) | | |
| | Silenciamiento génico posttranscripcional (GO:0016441) | 6,31 | |
| | Silenciamiento génico por RNA (GO:0031047) | 5,29 | |
| | Silenciamiento génico (GO:0016458) | 5,00 | |
| Estrés oxidativo | Regulación positiva de la generación de aniones superóxido (GO:0032930) | 25,00 | CDKN1A, IER3, PDGFB, F2RL1, SOD2, TGFB1, |
| | Regulación de generación de aniones superóxido (GO:0032928) | 13,33 | TGFBR2, RFK, MAPK14, IL10, RORA, WASL, |
| | Regulación del proceso metabólico del superóxido (GO:0090322) | 7,41 | ICAM1, CPS1, MAPK9, CAV1, CLU, PTGIS, |
| | Generación de aniones superóxido (GO:0042554) | 6,12 | HSP90AA1, SESN2, SESN3, PPP1R15B, |
| | Senescencia prematura inducida por estrés (GO:0090400) | 21,05 | TXNIP, MAPKAPK5, RYR2, NPAS2, |
| | Respuesta celular al hidroperóxido (GO:0071447) | 20,00 | CLOCK, OXR1, TP53INP1, MDM2, |
| | Respuesta al estado redox (GO:0051775) | 13,04 | MELK, MCL1, KDM6B, TRAP1, |
| | Regulación de la transcripción del | 12,50 | NONO, THBS1, |

| | | |
|---|-------|---|
| promotor de RNA polimerasa II en respuesta al estrés oxidativo (GO:0043619) | | BCL2, SOD2, FER, HIF1A, OXR1, TP53, PKD2, |
| Respuesta al hidróperóxido (GO:0033194) | 11,76 | TP53INP1, EPAS1, APEX1. |
| Respuesta al peróxido de hidrógeno (GO:0042542) | 3,59 | |
| Regulación negativa del proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0045019) | 9,68 | |
| Regulación del proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0045428) | 7,38 | |
| Proceso metabólico del óxido nítrico (GO:0046209) | 6,90 | |
| Proceso de biosíntesis de óxido nítrico (GO:0006809) | 6,76 | |
| Muerte celular en respuesta al estrés oxidativo (GO:0036473) | 6,48 | |
| Regulación positiva del proceso biosintético del óxido nítrico (GO:0045429) | 5,77 | |
| Regulación negativa de la ruta de señalización apoptótica intrínseca inducida por el estrés oxidativo (GO:1902176) | 8,89 | |

| | |
|---|------|
| Regulación de la ruta de señalización apoptótica intrínseca inducida por el estrés oxidativo (GO:1902175) | 8,47 |
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al estrés oxidativo (GO:0008631) | 8,43 |
| Regulación de la respuesta al estrés oxidativo (GO:1902882) | 6,36 |
| Regulación de la muerte celular inducida por el estrés oxidativo (GO:1903201) | 5,95 |
| Regulación negativa de la respuesta al estrés oxidativo (GO:1902883) | 5,56 |
| Regulación negativa de la respuesta celular al estrés oxidativo (GO:1900408) | 5,56 |
| Regulación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (GO:0050999) | 4,88 |
| Regulación de la respuesta celular al estrés oxidativo (GO:1900407) | 4,76 |
| Respuesta celular al estrés oxidativo (GO:0034599) | 4,15 |
| Regulación positiva del proceso | 9,52 |

| | | | |
|--------------------------------|---|--------------|-----------------------------|
| | metabólico de las especies de oxígeno reactivo (GO:2000379) | | |
| | Regulación del proceso | 5,38 | |
| | metabólico de la especie reactiva del oxígeno (GO:2000377) | | |
| | Proceso metabólico de las especies de oxígeno reactivo (GO:0072593) | 4,26 | |
| | Respuesta a especies reactivas de oxígeno (GO:0000302) | 3,95 | |
| | Respuesta celular a especies reactivas de oxígeno (GO:0034614) | 3,23 | |
| Regulación de vitaminas | Respuesta celular a vitaminas (GO:0071295) | 7,41 | MDM2, CCND1, SOD2, TGFB1, |
| | Respuesta a vitaminas (GO:0033273) | 6,25 | ITGB1, ITGA2, FASN, SLC2A3, |
| | Proceso metabólico de vitaminas hidrosolubles (GO:0006767) | 2,43 | RFK, TPK1, CYB5A. |
| Respuesta al oxígeno | Respuesta a la hiperoxia (GO:0055093) | 17,39 | MDM2, CDKN1A, MMP2, IRAK1, |
| | Respuesta celular a la hiperoxia (GO:0071455) | 20,00 | RORA, ERCC2, MECP2, E2F1, |
| | Homeostasis del oxígeno (GO:0032364) | 20,00 | VEGFA, PDGFB, ICAM1, THBS1, |
| | Respuesta a los niveles de | 8,03 | RYSR2, CAV1, BCL2, |

| | | | |
|-----------------------------------|---|--------------|---|
| | oxígeno (GO:0070482) | | SOD2, TGFB1, |
| | Respuesta celular al aumento de los niveles de oxígeno (GO:0036295) | 20,00 | BMP2, ATM, EGLN3, SLC6A4, FAS, HIF1A, PTGIS, |
| | Respuesta al aumento de los niveles de oxígeno (GO:0036296) | 17,39 | UBC, TSC2, TP53, ITGA2, GATA6, |
| | Respuesta celular a los niveles de oxígeno (GO:0071453) | 8,68 | EPAS1, HIF1AN, SMAD4, SMAD3, |
| | Respuesta celular a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036294) | 8,21 | RPS27A, TCEB1, OXR1, TP53INP1. |
| | Respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036293) | 7,89 | |
| Regulación del sist inmune | Regulación de la respuesta inflamatoria crónica (GO:0002676) | 20,00 | CYLD, MICB, ITCH, IL10, PTGER4, PDPK1, F2RL1, |
| | Respuesta inflamatoria crónica (GO:0002544) | 10,34 | THBS1, SOCS6, SOCS5, TGFB1, |
| | Diversificación somática de los receptores inmunes (GO:0002200) | 13,00 | PELI1, ATM, FAS, FER, TSPAN6, HMGB3, PRNP, |
| | Diversificación somática de los receptores inmunes vía mutación somática (GO:0002566) | 12,50 | TNFRSF21, PCBP2, RORA, MYO1F, ICAM1, YWHAZ, |
| | Diversificación somática de los receptores inmunes a través de la | 12,05 | CD28, WHSC1, TP53, AP1G1, |

| | | |
|--|------|---|
| recombinación de la línea germinal dentro de un único locus (GO:0002562) | | WASL, MAPK1, ARPC2, LIMK1, ELMO2, PIK3CA, |
| Regulación negativa del proceso del sistema inmunológico (GO:0002683) | 4,30 | CRK, WIPF2, YES1, ACTR2, HSP90AA1, BCL10, MSH3, |
| Regulación positiva del proceso efector inmunológico (GO:0002699) | 3,39 | TCF3, SEMA7A, NUGGC, POLM, TRAF3IP2, CCL5, |
| Respuesta inmune humoral (GO:0006959) | 2,36 | ADAR, BCL2, NOTCH2, GPI, CLU, |
| Producción de mediadores moleculares de respuesta inmune (GO:0002440) | 5,75 | HIST1H2BJ, HIST1H2BG, VPRBP, HMGB1, |
| Regulación de la producción del mediador molecular de la respuesta inmune (GO:0002700) | 5,07 | HMGB2, ASH1L, IER3, FEM1A, PTGIS, SMAD3. |
| La activación de células mieloides involucradas en la respuesta inmune (GO:0002275) | 5,05 | |
| Respuesta inmunitaria-reguladora de la superficie celular de señalización de la vía de acceso que intervienen en la fagocitosis (GO:0002433) | 5,02 | |
| Activación celular implicada en la | 4,81 | |

| | | | |
|-------------------------------------|--|--------------|--|
| | respuesta inmune (GO:0002263) | | |
| | Regulación negativa del proceso efector inmunológico (GO:0002698) | 4,44 | |
| | Regulación negativa de la respuesta inflamatoria (GO:0050728) | 5,41 | |
| Regulación de interleuquinas | Regulación positiva de la secreción de interleuquina 6 (GO:2000778) | 18,18 | STAT3, GAB1, FER, PTGIS, BCL10, ASH1L, IL10, |
| | Vía de señalización mediada por interleuquina 6 (GO:0070102) | 12,50 | F2RL1, F2R, TLR7, MAVS, TNFRSF21, |
| | Secreción de interleuquina 6 (GO:0072604) | 11,11 | THBS1, JAK1, ACSL4, MYLK3, |
| | Respuesta celular a la interleuquina 6 (GO:0071354) | 7,84 | IRAK1, ICAM1, MAPK9, CCL5, |
| | Respuesta a la interleuquina 6 (GO:0070741) | 6,67 | SELE, HIF1A, PTGIS, HAS2, |
| | Producción de interleuquina 6 (GO:0032635) | 3,73 | IFNAR1, ABCA1, F2RL1, F2R, |
| | Regulación positiva de la secreción de interleuquina 8 (GO:2000484) | 11,11 | SMAD3. |
| | Regulación positiva del proceso de biosíntesis de interleuquina 8 (GO:0045416) | 10,53 | |

| | |
|--|-------|
| Regulación del proceso biosintético de la interleuquina 8 (GO:0045414) | 8,00 |
| Proceso de biosíntesis de interleuquina 8 (GO:0042228) | 7,69 |
| Regulación de la secreción de interleuquina 8 (GO:2000482) | 7,41 |
| Secreción de interleuquina 8 (GO:0072606) | 6,45 |
| Regulación de la producción de interleuquina 8 (GO:0032677) | 4,90 |
| Producción de interleuquina 8 (GO:0032637) | 4,63 |
| Secreción de interleuquina 10 (GO:0072608) | 10,53 |
| Regulación negativa de la producción de interleuquina 12 (GO:0032695) | 8,70 |
| Respuesta a la interleuquina 15 (GO:0070672) | 8,00 |
| Respuesta celular a la interleuquina 1 (GO:0071347) | 7,48 |
| Respuesta a la interleuquina 1 (GO:0070555) | 5,56 |
| Producción de interleuquina 1 beta (GO:0032611) | 3,94 |

| | | | |
|------------------------------------|---|--------------|---|
| | Producción de interleuquina 1 (GO:0032612) | 3,57 | |
| Ubiquitinación de proteínas | Ubiquitinación ligada a la proteína K29 (GO:0035519) | 16,67 | UBOX5, ITCH, MARCH6, UBE2V2, |
| | Regulación de la poliubiquitinación de proteínas (GO:1902914) | 11,11 | UBE2Q2, TOPORS, BCL2, KLHL20, PELI1, MKRN1, |
| | Ubiquitinación ligada a la proteína K48 (GO:0070936) | 9,26 | SMURF1, HUWE1, UBC, TRIM32, |
| | Regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas implicadas en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina (GO:2000060) | 9,09 | RNF216, UBR5, RNF34, RNF146, RNF115, TNKS2, UBE2C, UBE2S, UBE3C, UBE4A, |
| | Proteína K63 vinculada desubiquitination (GO:0070536) | 8,16 | XIAP, RPS27A, CLU, PTEN, |
| | Proceso catabólico dependiente del SCF dependiente de la ubiquitina dependiente de proteínas (GO:0031146) | 7,89 | ZRANB1, CYLD, USP16, USP28, USP38, USP32, KAT2A, YOD1, |
| | Dependiente de la ubiquitina proceso catabólico a través de la multivesicular vía de selección del cuerpo (GO:0043162) | 7,41 | ATXN7, TRRAP, USP3, OTUD4, FBXO31, FBXL5, FBXL7, TSG101, |
| | Proceso catabólico de la proteína ubiquitina-dependiente asociada | 7,79 | FOXRED2, ERLIN1, TMEM67, DNAJB9, |

| | | |
|---|------|---|
| a ER (GO:0030433) | | DNAJC10, MDM2, |
| Desubiquitinación de proteínas (GO:0016579) | 6,99 | FBXO10, MYLIP, SEN1, RAD23B, |
| Regulación positiva del proceso catabólico proteasomal dependiente de ubiquitina- dependiente (GO:0032436) | 6,98 | SOCS5, WAC, N4BP1, PRICKLE1, CNOT4, TRIM37, TRIM71, FEM1B, |
| Ubiquitinación de proteínas implicadas en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina (GO:0042787) | 6,19 | FEM1A, LIMK1, BCL10. |
| Polyubiquitinación de proteínas (GO:0000209) | 5,88 | |
| Regulación del proceso catabólico proteasomal ubiquitin- dependiente proteína (GO:0032434) | 5,49 | |
| Autoubiquitinación de proteínas (GO:0051865) | 4,46 | |
| Ubiquitinación ligada a la proteína K63 (GO:0070534) | 4,44 | |
| Regulación negativa del proceso catabólico proteasomal dependiente de la ubiquitin (GO:0032435) | 3,70 | |
| Regulación de la actividad de la | 3,46 | |

| | | | |
|---|---|--------------|---|
| | ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051438) | | |
| | Regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031398) | 3,05 | |
| Regulación de macrófagos | Regulación positiva de la quimiotaxis de macrófagos (GO:0010759) | 15,38 | CCL5, RORA, THBS1, CLU, TLR7, ABCA1, MAPK9, TGFB1, SEMA7A. |
| | Regulación de la quimiotaxis de macrófagos (GO:0010758) | 10,00 | |
| | Activación de macrófagos (GO:0042116) | 4,30 | |
| | Diferenciación de células espumosas derivadas de macrófagos (GO:0010742) | 3,49 | |
| | Regulación de la producción de citoquinas de macrófagos (GO:0010935) | 9,09 | |
| | Producción de citoquinas de macrófagos (GO:0010934) | 8,70 | |
| Regulación de la autofagia | Regulación positiva de macroautofagia (GO:0016239) | 14,71 | SESN2, FBNP1L, TBC1D17, STK11, |
| | Regulación de macroautofagia(GO:0016241) | 9,09 | NBR1, ATG16L1, SQSTM1, DAPK3, |
| | Macroautofagia (GO:0016236) | 8,78 | BCL2, ACBD5, |
| | Regulación positiva de autofagia | 9,46 | RAB12, RAB23, |

| | | | |
|--|--|--------------|--|
| | (GO:0010508) | | OPTN, RAB12, |
| | Autofagia (GO:0006914) | 4,82 | TP53, WAC, |
| | Regulación de autofagia (GO:0010506) | 4,52 | TP53INP1, LARP1, ATG2B, ATG2A, ATG14, ULK1. |
| Regulación de la quimiocinas -quimiotaxis | Regulación de la vía de señalización mediada por quimiocinas (GO:0070099) | 13,33 | F3, VEGFA, PDGFB, F2RL1, THBS1, CCL5, TGFβ1, |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis positiva (GO:0050927) | 12,50 | PTPRO, ITGA2, BMPR2, SMAD3, TSC2, HMGB1, |
| | Regulación de la quimiotaxis positiva (GO:0050926) | 11,90 | HMGB2, MAPK9, HIF1A, TLR7, |
| | Quimiotaxis positiva (GO:0050918) | 10,75 | MAVS. |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis (GO:0050921) | 6,10 | |
| | Regulación positiva de la producción de quimioquinas (GO:0032722) | 5,80 | |
| | Regulación de la quimiotaxis (GO:0050920) | 4,87 | |
| | Regulación de la producción de quimioquinas (GO:0032642) | 4,81 | |
| | Producción de quimioquinas (GO:0032602) | 4,31 | |

| | | | |
|--|---|--------------|--|
| | Regulación positiva de la quimiotaxis leucocitaria (GO:0002690) | 3,67 | |
| Regulación de células dendríticas | Activación de células dendríticas mieloides (GO:0001773) | 13,16 | IL10, TGFB1, NOTCH2, TGFB2, HMGB1, CCL5, F2RL1. |
| | Diferenciación de células dendríticas mieloides (GO:0043011) | 10,34 | |
| | Quimiotaxis de células dendríticas (GO:0002407) | 6,90 | |
| | Diferenciación de células dendríticas (GO:0097028) | 4,60 | |
| Regulación de leucocitos | Regulación positiva de la desgranulación leucocitaria (GO:0043302) | 12,50 | MYH9, PAFAH1B1, VEGFA, CREB1, FAM213A, TGFB1, NOTCH2, KLF10, RUNX1, CUL4A, OSTM1, TGFB2, GNAS, RB1, GLO1, TMEM64, MYC, MAPK14, BTN3A1, CDKN1A, IL10, F2RL1, CCL5, CD28, BCL2, PELI1, ATM, TCF3, CLU, GPAM, TP53, |
| | Regulación de la desgranulación leucocitaria (GO:0043300) | 7,14 | |
| | Homeostasis de los leucocitos (GO:0001776) | 8,33 | |
| | Proceso apoptótico de leucocitos (GO:0071887) | 6,90 | |
| | Regulación negativa del proceso apoptótico de leucocitos (GO:2000107) | 6,85 | |
| | Regulación del proceso apoptótico de leucocitos | 6,02 | |

| | | |
|---|------|--|
| (GO:2000106) | | PRNP, TNFRSF21, |
| Regulación positiva del proceso apoptótico de los leucocitos | 5,88 | PTGER4, PDPK1, RORA, MYO1F, |
| (GO:2000108) | | ICAM1, YWHAZ, |
| Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002763) | 6,52 | SOCS5, WHSC1, FER, AP1G1, BCL10, FAS, HIF1A, |
| Diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002573) | 5,45 | PTEN, NOC2L, BCL2L11, |
| Regulación de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002761) | 4,74 | TNFRSF21, MEN1, SKIL, ITPKB, CYLD, SOCS6, HMGB3, |
| Regulación negativa de la activación leucocitaria (GO:0002695) | 5,13 | CLPTM1, THBS1, TLR7, HMGB1, SELE, ITGA2, |
| Regulación negativa de la diferenciación leucocitaria (GO:1902106) | 4,23 | CERCAM, ITGB1, HAS2. |
| Regulación negativa de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002762) | 4,23 | |
| Regulación de la diferenciación leucocitaria (GO:1902105) | 3,79 | |
| Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria (GO:1902107) | 3,60 | |

| | | | |
|--------------------------|---|-------------|--|
| | Activación leucocitaria mieloide (GO:0002274) | 5,77 | |
| | Activación leucocitaria implicada en la respuesta inmune (GO:0002366) | 4,81 | |
| | Desgranulación de leucocitos (GO:0043299) | 5,43 | |
| | Adhesión célula-célula de leucocitos (GO:0007159) | 4,88 | |
| | Regulación positiva de la migración de leucocitos (GO:0002687) | 4,79 | |
| | Regulación de la migración de leucocitos (GO:0002685) | 3,94 | |
| | Regulación negativa de la proliferación de leucocitos (GO:0070664) | 4,41 | |
| | Inmunidad mediada por leucocitos mieloides (GO:0002444) | 3,81 | |
| | Proliferación de leucocitos (GO:0070661) | 3,23 | |
| | Regulación de la proliferación de leucocitos (GO:0070663) | 3,05 | |
| Regulación de | Migración de eosinófilos (GO:0072677) | 8,00 | MYO1F, F2RL1, CCL5, PTGER4. |

| | | | |
|------------------------------------|--|-------------|--|
| granulocitos | Activación de neutrófilos (GO:0042119) | 7,14 | |
| | Activación de granulocitos (GO:0036230) | 6,12 | |
| Polimerización de proteínas | Homotrimerización de proteínas (GO:0070207) | 6,67 | BCL10, USP16, CEP57, CRTG3, |
| | Regulación de homooligomerización de proteínas (GO:0032462) | 6,00 | KCND3, KCNA7, KCNB1, KCTD7, ATG16L1, CAV1, |
| | Heterooligomerización de proteínas (GO:0051291) | 5,66 | SOD2, TNFAIP1, SKIL, ATL3, CPT1A, |
| | Regulación de la despolimerización de proteínas (GO:1901879) | 5,08 | SLC6A4, DNM1L, CLU, FAS, TSC2, SKI, PRNP, NACC2, |
| | Homooligomerización de proteínas (GO:0051260) | 5,07 | DCTPP1, BCL2L11, HSPA8, CFL2, |
| | Depolimerización de proteínas (GO:0051261) | 4,91 | F2RL1, GAK, STK11, SQSTM1, |
| | Tetramerización de proteínas (GO:0051262) | 4,81 | SEPT11, RRM2, CCL5, TP53, UXS1, |
| | Homotetramerización de proteínas (GO:0051289) | 4,67 | LIMA1, CKAP2, TMOD3, ICAM1, |
| | Regulación negativa de la despolimerización de proteínas (GO:1901880) | 4,64 | ARPC2, FER, TWF1, ADD1, ABI2, SLAIN2, TRIOBP, |
| | Regulación negativa de la | 3,95 | CAPZA2, TMSB10, |

| | | | |
|--|---|-------------|---|
| | polimerización de proteínas (GO:0032272) | | ACTR2. |
| | Regulación de la polimerización de proteínas (GO:0032271) | 3,35 | |
| | Regulación positiva de la polimerización de proteínas (GO:0032273) | 3,31 | |
| PBMC | Regulación de la migración de células mononucleares (GO:0071675) | 8,33 | THBS1, CCL5. |
| | Migración celular mononuclear (GO:0071674) | 7,69 | |
| Regulación de la catálisis de proteínas | Regulación positiva del proceso catabólico proteasomal de proteínas (GO:1901800) | 5,83 | IL10, MYCBP2, AZIN1, SMAD4, SMAD3, TIMP3, |
| | Regulación positiva de la proteólisis implicada en el proceso catabólico de la proteína celular (GO:1903052) | 5,66 | IER3, TRIM32, MDM2, SENP1, RAD23B, MYLIP, UBE2V2, SOCS5, |
| | Regulación negativa del proceso catabólico de proteínas (GO:0042177) | 5,49 | CLU, WAC, N4BP1, PRICKLE1, FBXL5, PTEN. |
| | Regulación del proceso proteasomal proteína catabólica (GO:0061136) | 4,50 | |
| | Regulación positiva del proceso | 4,41 | |

| | | | |
|------------|---|--------------|--|
| | catabólico de proteínas (GO:0045732) | | |
| | Regulación del proceso catabólico celular de proteínas (GO:1903362) | 3,93 | |
| | Regulación negativa del proceso catabólico proteasomal de proteínas (GO:1901799) | 3,53 | |
| | Regulación negativa de la proteólisis implicada en el proceso catabólico de la proteína celular (GO:1903051) | 3,53 | |
| | Regulación de la proteólisis implicada en el proceso catabólico de la proteína celular (GO:1903050) | 3,42 | |
| UPR | Respuesta de sobrecarga RE (GO:0006983) | 13,64 | FAM129A, CCND1, TMBIM6, THBS1, |
| | Respuesta al estrés del retículo endoplásmico (GO:0034976) | 6,63 | FKBP14, BCL2, ATF3, ANKS4B, |
| | Organización del retículo endoplásmico (GO:0007029) | 6,38 | ASNS, ADD1, TP53, PPP1R15B, |
| | RE UPR (GO:0030968) | 4,95 | PPP1R15A, TMX3, |
| | Activación de la actividad de la proteína de señalización implicada en la respuesta de | 4,20 | YOD1, SCAMP5, DNAJB9, TNFRSF10B, |

| | | | |
|---|--|-------------|--|
| | proteína desplegada (GO:0006987) | | EIF2S1, BCL2L11, CCDC47, DNAJC10, |
| | Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al estrés del retículo endoplásmico (GO:0070059) | 3,88 | RTN3, ATL3, GAK, HTT, RAB10, SEC16A. |
| | Respuesta celular a proteínas desplegadas (GO:0034620) | 4,66 | |
| Regulación de mastocitos | Regulación de la activación de los mastocitos implicados en la respuesta inmune (GO:0033006) | 6,25 | PDPK1, YWHAZ, FER. |
| | Activación de los mastocitos implicados en la respuesta inmune (GO:0002279) | 4,55 | |
| | Activación de mastocitos (GO:0045576) | 3,75 | |
| Regulación de monocitos | Quimiotaxis de monocitos (GO:0002548) | 3,85 | PDGFB, CCL5, PTPRO, MYH9, |
| | Diferenciación de monocitos (GO:0030224) | 3,85 | VEGFA, MYC. |
| Regulación de proteínas y péptidos | Replegamiento de proteínas (GO:0042026) | 8,33 | BTN3A1, BTN3A2, |
| | Desestabilización de proteínas (GO:0031648) | 7,89 | IFNAR1, IL10, |
| | Regulación positiva de la depolymerización de proteínas | 7,41 | PTGER4, PAFAH1B1, |

| | | |
|------------------------------------|------|-----------|
| (GO:1901881) | | ABCA1, |
| Plegamiento de proteínas | 7,14 | F2RL1, |
| mediado por chaperones | | CANX, |
| (GO:0061077) | | TGFB1, |
| Modificación de la proteína por la | 7,01 | NOTCH2, |
| eliminación de pequeñas | | DNM1L, |
| proteínas (GO:0070646) | | F2R, |
| Regulación de la estabilidad | 5,88 | GNAS, |
| proteica (GO:0031647) | | GPAM, |
| Respuesta a proteínas | 5,59 | SCAMP5, |
| topológicamente incorrectas | | RNF19B, |
| (GO:0035966) | | TRAF3IP2, |
| Estabilización de proteínas | 5,41 | GNPTAB, |
| (GO:0050821) | | TNFRSF21, |
| Regulación de la unión a | 5,31 | BLOC1S3, |
| proteínas (GO:0043393) | | HSPB2, |
| Mantenimiento de la localización | 4,91 | HSPA8, |
| de proteínas (GO:0045185) | | HSPA4L, |
| Mantenimiento de la localización | 4,78 | FAF2, |
| de proteínas en células | | CCND1, |
| (GO:0032507) | | TMBIM6, |
| Regulación negativa del | 4,71 | THBS1, |
| procesamiento de proteínas | | FKBP14, |
| (GO:0010955) | | ATF3, |
| Regulación negativa del | 4,49 | CLU, |
| transporte intracelular de | | ASNS, |

| | | |
|--|------|----------------------------|
| proteínas (GO:0090317) | | ADD1, |
| Secreción de proteínas (GO:0009306) | 4,38 | PPP1R15A, YOD1, |
| Respuesta a la proteína desplegada (GO:0006986) | 5,70 | DNAJB9, DNAJB4, |
| La orientación de proteínas a RE (GO:0045047) | 3,56 | EIF2S1, HSP90AA1, |
| Respuesta celular a proteínas topológicamente incorrectas (GO:0035967) | 4,19 | MDM2, ZBED3, MYLIP, |
| Regulación del transporte intracelular de proteínas (GO:0033157) | 3,97 | KAT2A, TAF9B, CREB1, |
| Localización de proteínas en el retículo endoplásmico (GO:0070972) | 3,85 | MAPK1, BCL2, SOX4, |
| Establecimiento de la localización de proteínas en el retículo endoplásmico (GO:0072599) | 3,90 | BMP2, TCF3, ATP1B3, |
| Regulación negativa del transporte de proteínas (GO:0051224) | 3,75 | AAK1, GAPDH, A1CF, |
| Regulación negativa de la secreción de proteínas (GO:0050709) | 3,70 | PTEN, USP3, CYLD, |
| Regulación positiva del | 3,59 | CDKN1A, |

| | | |
|--|------|--|
| procesamiento de proteínas (GO:0010954) | | MXI1, TCF7L2, |
| Regulación positiva de la maduración proteica (GO:1903319) | 3,59 | DYRK2, RANGAP1, RAB23, |
| Regulación positiva de la secreción de proteínas (GO:0050714) | 3,32 | PKD2, TLR7, MAVS, |
| Regulación negativa de la modificación de la proteína mediante conjugación o remoción de proteínas pequeñas (GO:1903321) | 2,67 | UBR5, MAPK14, SMAD4, SMAD3, DNAJC27, |
| Regulación de la secreción de proteínas (GO:0050708) | 2,54 | PFKFB2, MIDN, |
| Modificación de proteínas postraduccionales (GO:0043687) | 2,30 | KCNB1, REST, |
| Regulación de la secreción peptídica (GO:0002791) | 3,97 | CCL5, PRKACB, |
| Regulación del transporte de péptidos (GO:0090087) | 3,91 | HTT, CPT1A, |
| Secreción de péptidos (GO:0002790) | 3,85 | HIF1A, CLOCK, |
| Proceso metabólico peptídico (GO:0006518) | 2,22 | SPCS1, MGEA5, PRKAR1A, |

RAPGEF4,
PTGES3,
B2M,
CFL2,
TRAP1,
ZRANB1,
USP16,
USP28,
USP38,
USP32,
ITCH,
SENP1,
ATXN7,
COPS3,
TRRAP,
OTUD4,
MEN1,
CAPRIN2,
EPB41L5,
CAV1,
LRPAP1,
APP,
RAN,
ITGA2,
AKTIP,
MAPRE3,

RACGAP1,
CEP57,
MXI1,
HOOK3,
TOPORS,
FGFR1OP,
RB1,
NIN,
TWF1,
BICD2,
TMSB10,
FOPNL,
ANKRD13C,
RPSA,
RPL7,
RPL17,
RPL14,
RPL37,
RPL21,
RYS2,
RPL17-C18orf32,
RPS27A,
RPS15A,
WAC,
N4BP1,
TIMP2,

TIMP3,
UBE2V2,
SOCS5,
TRIM32,
PRICKLE1,
LIMK1,
UBC,
SPOPL,
UBE2C,
ICMT,
MUC21,
MUC17,
GANAB,
ARSJ,
PIGS,
PIGO,
SEC23A,
EIF5A2,
SOD2,
TMED10,
BACE1,
GLO1.

Tabla S 5. Funciones inhibidas por el miR-107.

| Función general | Función específica | % inhibición | genes inhibidos |
|---|---|--------------|---|
| Silenciamiento génico por miRNAs | Producción de siRNA involucrado en RNA de interferencia (GO:0030422) | 40,00 | TNRC6B, DICER1, SMARCA5, BAZ2A, AGO1, AGO2, |
| | Direccionamiento del RNAm para su destrucción implicada en la interferencia del RNA (GO:0030423) | 33,33 | AGO3, UBE2B, TARBP2, CPEB3. |
| | Procesamiento de Pre-miRNA (GO:0031054) | 25,00 | |
| | Proceso metabólico de miRNA (GO:0010586) | 8,11 | |
| | RNA de interferencia (GO:0016246) | 12,50 | |
| | Regulación positiva del proceso catabólico del RNAm (GO:0061014) | 10,71 | |
| | Regulación del proceso catabólico del RNAm (GO:0061013) | 9,68 | |
| | Producción de miRNAs implicados en el silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035196) | 8,57 | |

| | | | |
|------------------------------|--|--------------|---------------|
| | Producción de pequeños ARN implicada en el silenciamiento de genes por ARN (GO:0070918) | 7,89 | |
| | Regulación negativa de la traducción implicada en el silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035278) | 15,00 | |
| | Silenciamiento de genes postranscripcional (GO:0016441) | 4,90 | |
| | Silenciamiento de genes por RNA (GO:0031047) | 3,30 | |
| | Silenciamiento de genes posttranscripcional por RNA (GO:0035194) | 4,90 | |
| | Silenciamiento de genes por miRNA (GO:0035195) | 5,62 | |
| | Silenciamiento de genes (GO:0016458) | 3,30 | |
| Secreción de moco | Secreción de moco (GO:0070254) | 16,67 | PRKCE, ADORA3 |
| | Regulación de la secreción de moco (GO:0070255) | 18,18 | |
| | Regulación positiva de la secreción de moco | 25,00 | |

| (GO:0070257) | | | |
|------------------------------|---|--------------|---|
| Diferenciación sexual | Comportamiento reproductivo (GO:0019098) | 7,89 | UBE2Q1, PTEN, CREBRF, ARNT, |
| | Regulación positiva del proceso de biosíntesis hormonal (GO:0046886) | 22,22 | HIF1A, VEGFA, SALL1, PLEKHA1, FZD6, FOXC1. |
| | Diferenciación sexual (GO:0007548) | 1,30 | |
| | Desarrollo de las características sexuales primarias (GO:0045137) | 1,68 | |
| | | | |
| Regulación de lípidos | Regulación negativa del proceso de biosíntesis lipídica (GO:0051055) | 2,82 | TNRC6B, ADORA3, PLEKHA1, FGF2, PIK3R1, OGT, |
| | Señalización mediada por lípidos inositol (GO:0048017) | 2,67 | KLF4, RPS6KB1, AGO1, AGO2, |
| | Respuesta celular al agotamiento del colesterol (GO:0071501) | 25,00 | AGO3, FOXO1, PTEN, CAV1, IL6, FBXW7, PRKCE, |
| | Vía de señalización SREBP (GO:0032933) | 25,00 | INSIG1, ATG14, NUS1, MTMR3, |
| | Respuesta al agotamiento del colesterol (GO:0006991) | 22,22 | DECR1. |
| | Regulación de la actividad de la quinasa lipídica (GO:0043550) | 3,30 | |
| | Desfosforilación de fosfolípidos | 3,13 | |
| | | | |

| | | | |
|-------------------------|--|--------------|--|
| | (GO:0046839) | | |
| | Almacenamiento de lípidos | 2,44 | |
| | (GO:0019915) | | |
| | Regulación del proceso metabólico lipídico | 1,62 | |
| | (GO:0019216) | | |
| | Homeostasis lipídica | 1,49 | |
| | (GO:0055088) | | |
| | Proceso metabólico de lípidos neutros (GO:0006638) | 1,44 | |
| | Regulación del proceso metabólico de los triglicéridos (GO:0090207) | 3,92 | |
| | Proceso metabólico de los triglicéridos (GO:0006641) | 1,52 | |
| | Modificación de lípidos (GO:0030258) | 0,84 | |
| UPR | Regulación del retículo endoplasmático UPR (GO:1900101) | 15,38 | ERN1, CREBRF |
| Estrés oxidativo | Regulación de la transcripción del promotor ARN polimerasa II en respuesta al estrés oxidativo (GO:0043619) | 15,38 | PLEKHA1, CDK1, ALDH3B1, IL6, ARNT, HIF1A, KLF4, FBXW7, |
| | Regulación negativa del proceso biosintético del óxido | 13,33 | FOXO1, ABL2, OPRM1. |

nítrico (GO:0045019)

| | |
|------------------------|------|
| Regulación del proceso | 3,67 |
|------------------------|------|

biosintético del óxido nítrico

(GO:0045428)

| | |
|---------------------------------|------|
| Regulación positiva del proceso | 3,30 |
|---------------------------------|------|

biosintético del óxido nítrico

(GO:0045429)

| | |
|--------------------------|------|
| Regulación de la ruta de | 3,08 |
|--------------------------|------|

señalización apoptótica

intrínseca inducida por el estrés

oxidativo (GO:1902175)

| | |
|---------------------------------|------|
| Proceso de biosíntesis de óxido | 2,96 |
|---------------------------------|------|

nítrico (GO:0006809)

| | |
|-------------------------------|------|
| Respuesta celular al peróxido | 2,90 |
|-------------------------------|------|

de hidrógeno (GO:0070301)

| | |
|------------------------------|------|
| Proceso metabólico del óxido | 2,45 |
|------------------------------|------|

nítrico (GO:0046209)

| | |
|----------------------------------|------|
| Regulación de la actividad de la | 2,41 |
|----------------------------------|------|

óxido nítrico sintasa

(GO:0050999)

| | |
|-----------------------------|------|
| Respuesta celular al estrés | 2,14 |
|-----------------------------|------|

oxidativo (GO:0034599)

| | |
|--------------------------|------|
| Respuesta al peróxido de | 2,09 |
|--------------------------|------|

hidrógeno (GO:0042542)

| | |
|----------------------------|------|
| Regulación de la actividad | 1,52 |
|----------------------------|------|

oxidorreductasa (GO:0051341)

| | | | |
|---|--|--------------|---|
| | Respuesta celular a especies reactivas de oxígeno (GO:0034614) | 2,23 | |
| | Respuesta a especies reactivas de oxígeno (GO:0000302) | 1,59 | |
| Respuesta a los niveles de oxígeno | Respuesta celular al aumento de los niveles de oxígeno (GO:0036295) | 11,76 | PRKCE, VEGFA, CAV1, TGFB3, ARNT, HIF1A, |
| | Respuesta al aumento de los niveles de oxígeno (GO:0036296) | 6,67 | ITGA2, FOXO1, UBE2B |
| | Respuesta a la hiperoxia (GO:0055093) | 6,67 | |
| | Respuesta celular a los niveles de oxígeno (GO:0071453) | 2,43 | |
| | Respuesta a los niveles de oxígeno (GO:0070482) | 1,92 | |
| | Respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036293) | 1,81 | |
| | Respuesta celular a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036294) | 1,75 | |
| | Regulación de la transcripción del promotor de RNA polimerasa II en respuesta a la | 3,75 | |

| | | | |
|--|--|--------------|--|
| | hipoxia (GO:0061418) | | |
| | Respuesta a | 1,83 | |
| | hipoxia(GO:0001666) | | |
| | Respuesta celular a hipoxia | 1,79 | |
| | (GO:0071456) | | |
| | Respuesta celular a hipoxia | 11,76 | |
| | (GO:0071455) | | |
| | Homeostasis del gas | 11,11 | |
| | (GO:0033483) | | |
| Regulación de la ubiquitinación | Regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas implicadas en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina (GO:2000060) | 10,00 | CDK1, PSMB6, FBXW7, PTEN, RBBP6, CAV1, OGT, N4BP1, DNAJA1, PSMB6, USP42, OTUD7B, BABAM1. |
| | Proteína K63 vinculada deubiquitination (GO:0070536) | 3,92 | |
| | Regulación de la ubiquitinación de proteínas implicadas en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina (GO:2000058) | 2,67 | |
| | Regulación positiva de la actividad de ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051443) | 1,76 | |
| | Regulación negativa de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031397) | 1,56 | |

Regulación positiva de la actividad ubiquitina-proteína ligasa implicada en la regulación de la transición del ciclo celular mitótico (GO:0051437) 1,56

Regulación de la actividad de la ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051438) 1,52

Deubiquitination de proteínas (GO:0016579) 1,51

Regulación de la actividad ubiquitina-proteína ligasa involucrada en el ciclo celular mitótico (GO:0051439) 1,46

Ubiquitinación de proteínas implicadas en el proceso catabólico dependiente de la ubiquitina (GO:0042787) 1,35

anafase-promotora dependiente del complejo proteasomal dependiente del proceso catabólico de la proteína ubiquitina (GO:0031145) 1,32

Regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas 1,08

| | | | |
|-----------------------------------|---|-------------|---|
| | (GO:0031398) | | |
| Regulación de glúcidos | Proceso glucolítico (GO:0006096) | 1,23 | DYRK2, ARNT, FOXO1, ARNT, |
| | Regulación positiva del proceso glucolítico (GO:0045821) | 8,00 | OGT, IL6, PIK3R1, SLC2A3, NUP50, |
| | Regulación positiva del proceso metabólico de glucoproteínas (GO:1903020) | 7,41 | PRKCE, HIF1A, ITGA2, RPS6KB1, TJP1, ACVR2B, |
| | Regulación del proceso catabólico de carbohidratos celulares (GO:0043471) | 4,84 | PTEN, RAB1B, PAWR, PHKA1. |
| | Regulación del proceso catabólico de carbohidratos (GO:0043470) | 4,84 | |
| | Regulación positiva del proceso metabólico los carbohidratos celulares (GO:0010676) | 4,03 | |
| | Regulación positiva del proceso metabólico de carbohidratos (GO:0045913) | 3,65 | |
| | Regulación de proceso glucolítico (GO:0006110) | 5,77 | |
| | Homeostasis de glucosa celular (GO:0001678) | 3,68 | |
| | Regulación de la secreción de insulina implicada en la | 3,45 | |

respuesta celular al estímulo de
glucosa (GO:0061178)

Respuesta a monosacáridos 3,26
(GO:0034284)

Regulación del proceso 3,23
metabólico de glucoproteínas
(GO:1903018)

Secreción de insulina implicada 3,13
en la respuesta celular al
estímulo de glucosa
(GO:0035773)

Respuesta a la glucosa 3,02
(GO:0009749)

Proceso catabólico de 3,01
carbohidratos celulares
(GO:0044275)

Respuesta a la hexosa 2,86
(GO:0009746)

Respuesta celular al estímulo de 2,65
glucosa (GO:0071333)

Regulación positiva del proceso 2,44
metabólico de glucosa
(GO:0010907)

Respuesta celular al estímulo de 2,13
carbohidratos (GO:0071322)

Regulación del proceso 2,12

metabólico de glucosa

(GO:0010906)

Homeostasis de carbohidratos 2,05

(GO:0033500)

Homeostasis de glucosa 2,05

(GO:0042593)

Respuesta celular al estímulo de 2,50

hexosa (GO:0071331)

Regulación del transporte de 1,51

glucosa (GO:0010827)

Proceso de biosíntesis de 1,46

monosacáridos (GO:0046364)

Transporte de glucosa 1,42

(GO:0015758)

Transporte de hexosa 1,39

(GO:0008645)

Proceso de biosíntesis de 1,54

hexosa (GO:0019319)

Respuesta a los carbohidratos 2,82

(GO:0009743)

Regulación del proceso 2,56

metabólico de carbohidratos

celulares (GO:0010675)

Regulación del proceso 2,41

metabólico de carbohidratos

(GO:0006109)

| | | | |
|---|---|-------------|---|
| | Regulación del proceso biosintético de carbohidratos(GO:0043255) | 2,20 | |
| | Transporte de carbohidratos (GO:0008643) | 1,05 | |
| | Proceso catabólico de carbohidratos de un solo organismo (GO:0044724) | 0,95 | |
| | Proceso catabólico de carbohidratos (GO:0016052) | 0,90 | |
| | Transporte de monosacáridos (GO:0015749) | 1,37 | |
| | Respuesta celular al estímulo de monosacáridos (GO:0071326) | 2,48 | |
| Regulación de proteínas y péptidos | Procesamiento del péptido señal (GO:0006465) | 7,14 | PRKCE, UBE2Q1, IL6, HIF1A, |
| | Proceso de biosíntesis de péptidos (GO:0043043) | 2,60 | ACVR2B, TBRG1, FBXW7, PTEN, |
| | Secreción peptídica (GO:0002790) | 1,02 | UBE2B, RACGAP1, KDELR1, CAV1, |
| | Regulación del procesamiento de proteínas (GO:0070613) | 1,00 | SUN2, TWF1, RPSA, RPL27, |
| | Regulación positiva del procesamiento de proteínas (GO:0010954) | 1,73 | RPS24, DYRK2, G3BP2, AXIN2, OPRM1, PCSK5, |
| | Regulación de la maduración | 1,00 | SNCG, NOTCH2, |

| | | |
|---------------------------------|------|----------------|
| proteica(GO:1903317) | | ABL2, FURIN, |
| Regulación positiva de la | 1,73 | GANAB, B3GNT2, |
| maduración de | | ATG12. |
| proteínas(GO:1903319) | | |
| Estabilización de proteínas | 1,71 | |
| (GO:0050821) | | |
| Regulación de la estabilidad | 1,17 | |
| proteica (GO:0031647) | | |
| Mantenimiento de la | 1,76 | |
| localización de proteínas | | |
| (GO:0045185) | | |
| Mantenimiento de la | 1,62 | |
| localización de proteínas en la | | |
| célula (GO:0032507) | | |
| Mantenimiento de la | 3,17 | |
| localización de proteínas en | | |
| organelas (GO:0072595) | | |
| Localización de proteínas en el | 1,25 | |
| retículo endoplasmático | | |
| (GO:0070972) | | |
| Regulación negativa del | 1,62 | |
| transporte de | | |
| proteínas(GO:0051224) | | |
| Regulación negativa del | 1,64 | |
| transporte intracelular de | | |
| proteínas (GO:0090317) | | |

| | | | |
|--------------------------------------|--|-------------|------------------------------------|
| | Secreción de proteínas (GO:0009306) | 1,24 | |
| | Modificación de la proteína postraduccion (GO:0043687) | 0,82 | |
| quimiocinas y quimiotaxis | Regulación de la quimiotaxis (GO:0050920) | 1,28 | VEGFA, FGF2, ITGA2, IL6, HIF1A, |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis (GO:0050921) | 1,81 | KLF4. |
| | Quimiotaxis positiva(GO:0050918) | 2,86 | |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis positiva (GO:0050927) | 4,88 | |
| | Regulación de la quimiotaxis positiva (GO:0050926) | 4,65 | |
| | Producción de quimioquinas (GO:0032602) | 2,59 | |
| | Regulación de la producción de quimioquinas (GO:0032642) | 2,88 | |
| | Regulación positiva de la producción de quimioquinas (GO:0032722) | 2,90 | |
| Regulación de iones | Respuesta celular al ion amonio (GO:0071242) | 4,88 | DAPK1, CAB39, SNCG, GABRB1, |
| | Respuesta al ion amonio (GO:0060359) | 4,04 | SLC30A7, DMPK, YWHAH, PER1, |

| | | |
|---|------|---------------------------------------|
| Respuesta al ion cobre (GO:0046688) | 4,76 | MT1E, CDK1, IL6, TK1, PTEN, PRKCE, |
| Respuesta al ion cadmio (GO:0046686) | 4,76 | FGF2, CAV1, ABL2, OPRM1. |
| Respuesta al ion zinc (GO:0010043) | 3,77 | |
| Secuestro de iones metálicos (GO:0051238) | 3,66 | |
| Secuestro de ion calcio (GO:0051208) | 3,28 | |
| Regulación del transporte de iones de sodio (GO:0002028) | 2,96 | |
| Regulación de la actividad transportadora transmembrana de ion sodio (GO:2000649) | 2,86 | |
| Respuesta a los iones metálicos (GO:0010038) | 1,24 | |
| Regulación positiva de la concentración de iones calcio citósolicos (GO:0007204) | 1,07 | |
| Homeostasis de los iones cálcicos citósolicos (GO:0051480) | 1,01 | |
| Regulación de la actividad transportadora transmembrana iónica (GO:0032412) | 1,70 | |

| | | | |
|-----------------------------------|---|-------------|--|
| | Regulación negativa de la actividad transportadora transmembrana iónica (GO:0032413) | 3,08 | |
| Regulación de fibroblastos | Migración de fibroblastos (GO:0010761) | 3,57 | TNRC6B, FGFR1, PRKCE, FGF2, |
| | Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0008543) | 2,47 | CDK1, PIK3R1, PPP2CA, AGO1, AGO2, AGO3, |
| | Regulación de la migración de fibroblastos (GO:0010762) | 4,17 | FOXO1, PTEN. |
| Regulación de la autofagia | Regulación positiva de la autofagia (GO:0010508) | 3,90 | EI24, WDR6, PAFAH1B2, |
| | Regulación de la autofagia (GO:0010506) | 3,23 | DAPK1, RAB1B, TM9SF1, ABL2, |
| | Regulación de la macroautofagia (GO:0016241) | 2,94 | FOXO1, ATG12, ATG14. |
| | Macroautofagia (GO:0016236) | 2,47 | |
| | Autofagia (GO:0006914) | 2,23 | |
| Regulación de citoquinas | Regulación negativa del proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042036) | 3,77 | PCSK5, IL6, REL, PAWR, KLF4, CAV1, JAK1, |
| | Proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042089) | 2,65 | HIF1A, CREBRF, FURIN, OTUD7B, |
| | Proceso metabólico de las citoquinas (GO:0042107) | 2,59 | ATG12. |

| | | | |
|--|--|-------------|---|
| | Regulación de la respuesta al estímulo de citoquinas (GO:0060759) | 1,87 | |
| | Regulación del proceso de biosíntesis de citoquinas (GO:0042035) | 1,71 | |
| | Regulación de la vía de señalización mediada por citoquinas (GO:0001959) | 1,61 | |
| | Regulación negativa de la producción de citoquinas (GO:0001818) | 1,13 | |
| Regulación de la respuesta inmune | Producción de mediadores moleculares implicados en la respuesta inflamatoria (GO:0002532) | 3,77 | PRKCE, ADORA3, CD180, IL6, MYB, RNF168, MAP3K7, RNF168, PER1, |
| | Respuesta inmune específica de órganos o tejidos (GO:0002251) | 3,64 | OTUD7B, NOTCH2, OPRM1, |
| | Respuesta inflamatoria al estímulo antigénico (GO:0002437) | 3,64 | PIK3R1, ACTR2, ASH1L, METRNL, KLF4, BTLA, |
| | Activación celular implicada en la respuesta inmune (GO:0002263) | 1,98 | PAWR, PAG1, TARBP2, ITGA2, PLEKHA1, PIK3R1, |
| | Producción de mediadores moleculares de respuesta | 1,34 | PTEN. |

| | | | |
|--------------------------------------|---|-------------|----------------------------------|
| | inmune (GO:0002440) | | |
| | Respuesta inmunitaria- reguladora de la superficie celular de la vía de señalización que intervienen en la fagocitosis (GO:0002433) | 1,32 | |
| | Regulación negativa de la respuesta inflamatoria (GO:0050728) | 2,01 | |
| | Regulación positiva del proceso efector inmunológico (GO:0002699) | 1,17 | |
| | Regulación negativa del proceso del sistema inmunológico (GO:0002683) | 0,83 | |
| | Regulación positiva de la respuesta inflamatoria (GO:0050729) | 1,74 | |
| | Vía de señalización mediada por receptor de antígeno (GO:0050851) | 1,57 | |
| IL y receptores tipo toll | Respuesta a la interleucina-6 (GO:0070741) | 3,17 | IL6, MYB, PAWR, ABL2, MAP3K7, |
| | Respuesta celular a la interleucina-6 (GO:0071354) | 3,70 | PRKCE, CDK1 . |
| | Producción de interleucina-2 | 3,09 | |

| | | | |
|---------------------------------|--|-------------|--|
| | (GO:0032623) | | |
| | MyD88-independiente toll-like | 1,33 | |
| | receptor de señalización vía | | |
| | (GO:0002756) | | |
| Regulación de linfocitos | Regulación negativa de la activación de linfocitos (GO:0051250) | 1,52 | CDK6, PIK3R1, MYB, ABL2, BTLA, CD180, IL6, |
| | Activación de linfocitos implicados en la respuesta inmune (GO:0002285) | 1,95 | PAWR, HPRT1, CAV1, RNF168, PAG1. |
| | Diferenciación de las células T alfa-beta CD4-positivas implicada en la respuesta inmune (GO:0002294) | 2,94 | |
| | La activación de células B implicada en la respuesta inmune (GO:0002312) | 2,56 | |
| | Diferenciación de células T implicada en la respuesta inmune (GO:0002292) | 2,44 | |
| | Activación de células T alfa-beta implicada en la respuesta inmune (GO:0002287) | 2,82 | |
| | Diferenciación de las células T alfa-beta implicada en la respuesta inmune | 2,82 | |

| | | | |
|-----------------------|--|-------------|---|
| | (GO:0002293) | | |
| | Coestimulación de linfocitos | 1,36 | |
| | (GO:0031294) | | |
| | Proliferación de linfocitos | 1,04 | |
| | (GO:0046651) | | |
| | Diferenciación de linfocitos | 1,00 | |
| | (GO:0030098) | | |
| Muerte celular | Muerte celular programada de desarrollo (GO:0010623) | 2,78 | FGF2, FOXC1, VEGFA, CSNK2A1, |
| | Regulación negativa de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043154) | 2,41 | IL6, KLF4, PPP2R5C, DYRK2, PIK3R1, EI24, CAV1, FBXW7, |
| | Regulación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043281) | 0,80 | PTEN, NACC2, DAPK1, HIF1A, RPS6KB1, MAP3K7. |
| | Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA (GO:0008630) | 1,66 | |
| | Regulación positiva de la vía de señalización apoptótica intrínseca (GO:2001244) | 2,88 | |
| | Regulación positiva de la vía de señalización apoptótica (GO:2001235) | 1,62 | |
| | | | |
| | | | |

| | | | |
|--|---|-------------|---|
| | Regulación de la vía de señalización apoptótica intrínseca (GO:2001242) | 1,58 | |
| | Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica (GO:2001234) | 1,04 | |
| Regulación del aparato respiratorio | Desarrollo del sistema respiratorio (GO:0060541) | 2,52 | PCSK5, FGFR1, VEGFA, FGF2, |
| | Desarrollo de tubo respiratorio (GO:0030323) | 2,84 | DICER1, NUMB, ATXN1L, FBXW7, |
| | Desarrollo pulmonar (GO:0030324) | 2,52 | ACVR2B |
| Desarrollo hepático | Desarrollo del sistema hepatobiliar (GO:0061008) | 2,76 | TGFR3, TK1, ITGA2, FBXW7 |
| | Desarrollo del hígado (GO:0001889) | 2,82 | |
| Detoxificación | Respuesta a la sustancia tóxica (GO:0009636) | 1,89 | CDK1, JAK1, IL6, TK1, RPS6KB1, |
| | Proceso catabólico del alcohol (GO:0046164) | 2,65 | ALDH3B1, PTEN, ENPP2. |
| Regulación de leucocitos | Regulación positiva de la migración de leucocitos (GO:0002687) | 2,74 | PRKCE, ADORA3, CD180, IL6, MYB, RNF168, TGA2, |
| | Activación leucocitaria implicada en la respuesta inmune (GO:0002366) | 1,98 | BTLA, PAWR, PAG1, VEGFA, NOTCH2, PIK3R1, |

| | | | |
|------------------------------------|---|-------------|---|
| | Regulación de la migración de leucocitos (GO:0002685) | 1,97 | OGT, HIF1A, PTEN. |
| | Regulación negativa de la activación leucocitaria (GO:0002695) | 1,26 | |
| | positive regulation of leukocyte differentiation(GO:1902107) | 1,25 | |
| | Diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002573) | 1,17 | |
| | Proceso apoptótico de leucocitos (GO:0071887) | 1,67 | |
| | Regulación de la diferenciación leucocitaria (GO:1902105) | 0,95 | |
| Polimerización de proteínas | Regulación de la unión de proteínas (GO:0043393) | 1,91 | CAV1, TGFBR3, ABL2, ITGA2, |
| | Regulación positiva de la unión de proteínas(GO:0032092) | 2,73 | EML4, DECR1, TK1, HPRT1, |
| | Regulación negativa de la despolimerización de proteínas (GO:1901880) | 2,52 | PRKCE, TUBA1B, TWF1, ADD2, TUBB, CLIP1, |
| | Homotetramerización de proteínas (GO:0051289) | 2,48 | SLAIN2, CAPZA2, ACTR2. |
| | Regulación negativa de la polimerización de proteínas(GO:0032272) | 1,95 | |
| | Regulación de la polimerización | 1,93 | |

| | | | |
|---|---|-------------|--|
| | de proteínas(GO:0032271) | | |
| | Regulación positiva de la polimerización de proteínas (GO:0032273) | 2,20 | |
| | Regulación de la polimerización de proteínas(GO:1901879) | 2,13 | |
| | Polimerización de proteínas (GO:0051258) | 1,80 | |
| | Despolimerización de proteínas(GO:0051261) | 1,69 | |
| | Tetramerización de proteínas (GO:0051262) | 1,43 | |
| Regulación del proceso catabólico de proteínas | Regulación positiva del proceso catabólico de proteínas (GO:0045732) | 2,59 | FURIN, CSNK2A1, FBXW7, FOXO1, PTEN, CREBRF, N4BP1, FBXW7. |
| | Regulación del proceso proteasomal proteína catabólica (GO:0061136) | 1,28 | |
| | Regulación del proceso catabólico de proteínas celulares (GO:1903362) | 1,26 | |
| Respuesta a lesiones | Regulación negativa de la respuesta a las heridas (GO:1903035) | 2,34 | ASH1L, FGF2, METRNL, KLF4, PRKCE, ADORA3, IL6, ITGA2, CAV1. |
| | Regulación positiva de la respuesta a las heridas | 1,79 | |

| | | |
|---|------|-------------------------------|
| (GO:1903036) | | |
| Regulación de cicatrización de heridas (GO:0061041) | 1,24 | |
| Proliferación de células mononucleares (GO:0032943) | 1,02 | BTLA, CD180, IL6, PAWR, HPRT1 |

Tabla S 6. Funciones inhibidas por el miR-23b.

| Función general | Función específica | % inhibición | genes inhibidos |
|--------------------------------|--|--------------|---|
| IL | Secreción de interleuquina-4 (GO:0072602) | 40,00 | NOTCH2, NOTCH1, IMPDH2, STAT5B, JAK1. |
| | Respuesta a interleuquina-4 (GO:0070670) | 3,33 | |
| | Producción de interleuquina-4 (GO:0032633) | 3,64 | |
| | Respuesta a interleuquina-15 (GO:0070672) | 8,00 | |
| Regulación de células B | Regulación de la diferenciación de células pro-B (GO:2000973) | 28,57 | MSH6, BTLA, VAV3, FNIP1, SWAP70, TNFAIP3, PTK2B, VCAM1, ADAM17, STAT5B, NOTCH1, PTEN. |
| | Diferenciación de células B (GO:0030183) | 2,81 | |
| | Diferenciación de células pro-B (GO:0002328) | 12,50 | |
| | Regulación del proceso apoptótico de células B (GO:0002902) | 8,33 | |

| | | | |
|---------------------------------|--|--------------|---|
| | Proceso apoptótico de células B (GO:0001783) | 6,06 | |
| | Regulación negativa de la activación de células B (GO:0050869) | 4,17 | |
| | Activación de células B (GO:0042113) | 2,69 | |
| | Activación de células B implicada en la respuesta inmune(GO:0002312) | 4,11 | |
| | Regulación de la activación de células B (GO:0050864) | 2,37 | |
| Regulación hepática | Desarrollo del hígado (GO:0001889) | 4,03 | SOD2, NOTCH1, ACAT1, HMGCS1, |
| | Proceso apoptótico del hepatocito (GO:0097284) | 16,67 | MET, STAT5B, RB1, BCL2L1. |
| | Desarrollo del sistema hepatobiliar (GO:0061008) | 3,95 | |
| Respuesta a lesiones | Angiogénesis implicada en la cicatrización de heridas (GO:0060055) | 11,76 | ETS1, TNFAIP3, DMTN, TNFAIP3, GJA1, PLAU. |
| | Regulación de la cicatrización de heridas (GO:0061041) | 1,70 | |
| Estrés oxidativo | Regulación negativa de la muerte celular inducida por peróxido de hidrógeno | 11,54 | MPV17, PRDX1, SESN2, CDK2, SOD2, ETS1, |

| | | |
|--|--------------|------------------|
| (GO:1903206) | | TNFAIP3, |
| Regulación de la muerte celular | 10,34 | PPARGC1B, PTK2B, |
| inducida por peróxido de | | MET, SRC, PSAP, |
| hidrógeno (GO:1903205) | | GNB2L1 |
| Muerte celular en respuesta al | 10,34 | |
| peróxido de hidrógeno | | |
| (GO:0036474) | | |
| Regulación negativa de la | 10,00 | |
| respuesta a especies reactivas de | | |
| oxígeno (GO:1901032) | | |
| Regulación negativa de la muerte | 8,33 | |
| celular inducida por el estrés | | |
| oxidativo (GO:1903202) | | |
| Regulación de la muerte celular | 4,49 | |
| inducida por el estrés oxidativo | | |
| (GO:1903201) | | |
| Muerte celular en respuesta al | 3,54 | |
| estrés oxidativo (GO:0036473) | | |
| Respuesta a especies reactivas de | 4,29 | |
| oxígeno (GO:0000302) | | |
| Regulación de la respuesta a | 7,02 | |
| especies reactivas de oxígeno | | |
| (GO:1901031) | | |
| Respuesta celular a especies | 4,69 | |
| reactivas de oxígeno | | |
| (GO:0034614) | | |

| | |
|--|------|
| Eliminación de radicales superóxido (GO:0019430) | 6,67 |
| Respuesta celular al radical oxígeno (GO:0071450) | 6,25 |
| Respuesta al superóxido (GO:0000303) | 5,71 |
| Respuesta celular al superóxido (GO:0071451) | 6,25 |
| Respuesta al radical oxígeno (GO:0000305) | 5,71 |
| Respuesta al peróxido de hidrógeno (GO:0042542) | 4,69 |
| Respuesta celular al peróxido de hidrógeno (GO:0070301) | 4,32 |
| Regulación negativa de la respuesta al estrés oxidativo (GO:1902883) | 5,26 |
| Regulación negativa de la respuesta celular al estrés oxidativo (GO:1900408) | 5,26 |
| Regulación de la respuesta al estrés oxidativo (GO:1902882) | 4,24 |
| Regulación de la respuesta celular al estrés oxidativo (GO:1900407) | 3,64 |
| Respuesta celular al estrés oxidativo (GO:0034599) | 2,39 |

| | | | |
|---------------------------------|--|--------------|---|
| | Proceso metabólico de las especies reactivas del oxígeno (GO:0072593) | 1,26 | |
| quimiotaxis | Regulación de la quimiotaxis de las células endoteliales (GO:2001026) | 10,00 | NOTCH1, VAV3, DOCK4, NOTCH1, PTK2B, VCAM1, MET, ADAM17, HMGB2, PTK2B. |
| | Quimiotaxis de células endoteliales (GO:0035767) | 4,00 | |
| | Quimiotaxis celular (GO:0060326) | 1,77 | |
| | Regulación positiva de la quimiotaxis (GO:0050921) | 1,76 | |
| | Regulación de la quimiotaxis (GO:0050920) | 1,68 | |
| Regulación de células T | Homeostasis de las células T (GO:0043029) | 3,57 | ADAM17, STAT5B, PTEN, RPL22, |
| | Diferenciación de las células T en el timo (GO:0033077) | 2,80 | RUNX2, ZEB1, CHUK, TAB2, |
| | Diferenciación de células T (GO:0030217) | 1,42 | RPS27A, CCNB2. |
| | Vía de señalización del receptor de células T (GO:0050852) | 1,30 | |
| | Diferenciación de células progenitoras linfoides (GO:0002320) | 7,14 | MSH6, SWAP70, TNFAIP3, PTK2B, ADAM17, STAT5B, |
| Regulación de linfocitos | Quimiotaxis linfocitario (GO:0048247) | 4,26 | SOCS6, CCNB2, BTLA, FNIP1. |

| | | | |
|--------------|---|-------------|-----------------------------------|
| | Regulación de la quimiotaxis linfocítica (GO:1901623) | 7,14 | |
| | Regulación positiva de la migración de linfocitos (GO:2000403) | 4,00 | |
| | Homeostasis de linfocitos (GO:0002260) | 3,45 | |
| | Regulación de la migración de linfocitos (GO:2000401) | 3,23 | |
| | Regulación negativa de la activación de los linfocitos (GO:0051250) | 1,52 | |
| | Activación de linfocitos implicados en la respuesta inmune (GO:0002285) | 1,39 | |
| | Proliferación de linfocitos (GO:0046651) | 1,05 | |
| | Regulación de la proliferación de linfocitos (GO:0050670) | 1,05 | |
| iones | Respuesta al ion zinc (GO:0010043) | 7,41 | GJA1, SRC, DIAPH1, GNB2L1, |
| | Regulación de la homeostasis de iones (GO:2000021) | 1,71 | DMTN, ITPR3, SOD2, CA2, PTK2B, |
| | Respuesta a los iones metálicos (GO:0010038) | 1,47 | VCAM1, PTEN, ATP1A1, SLC9A6. |
| | Homeostasis de catión inorgánico | 1,69 | |

| | | | |
|-----------------------------------|--|-------------|---|
| | monovalente (GO:0055067) | | |
| Regulación de fibroblastos | Regulación de la migración de fibroblastos (GO:0010762) | 5,26 | DMTN, GNA12, CDC73, SOD2, |
| | Regulación negativa de la proliferación de fibroblastos (GO:0048147) | 3,64 | TNRC6B, TNRC6A, CHUK, RAF1, ITPR3, SOS1, |
| | Migración de fibroblastos (GO:0010761) | 4,35 | RUNX2, PRKACB, SRC, PTEN, |
| | Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (GO:0008543) | 2,28 | RPS27A. |
| Muerte celular | Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica extrínseca a través de receptores del dominio de muerte (GO:1902042) | 5,08 | DDX47, RAF1, TNFAIP3, HMGB2, BLOC1S2, KDM1A, MSH6, SOD2, EP300, BCL2L1, |
| | Regulación de la vía de señalización apoptótica extrínseca vía receptores de dominio de muerte (GO:1902041) | 3,26 | FNIP1, TNFAIP8, SRC, GNB2L1, RAF1SRC, SERINC3, PTEN, |
| | Vía de señalización apoptótica extrínseca vía receptores de dominio de muerte (GO:0008625) | 2,73 | NMT1. |
| | Regulación negativa de la ruta de señalización apoptótica intrínseca en respuesta al daño del DNA | 3,03 | |

(GO:1902230)

| | |
|--|------|
| Vía de señalización apoptótica intrínseca en respuesta a daño del DNA (GO:0008630) | 1,66 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Regulación negativa de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043154) | 2,40 |
|--|------|

| | |
|---|------|
| Regulación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína implicada en el proceso apoptótico (GO:0043281) | 1,00 |
|---|------|

| | |
|--|------|
| Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica intrínseca (GO:2001243) | 2,35 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica extrínseca (GO:2001237) | 2,28 |
|--|------|

| | |
|--|------|
| Regulación positiva de la vía de señalización apoptótica intrínseca (GO:2001244) | 2,07 |
|--|------|

| | |
|---|------|
| Regulación de la vía de señalización apoptótica intrínseca (GO:2001242) | 1,90 |
|---|------|

| | |
|--|------|
| Regulación negativa de la vía de señalización apoptótica | 1,87 |
|--|------|

| | | | |
|-------------------------------|---|-------------|--|
| | (GO:2001234) | | |
| | Regulación de la vía de señalización apoptótica extrínseca (GO:2001236) | 1,34 | |
| | Regulación positiva de la vía de señalización apoptótica (GO:2001235) | 1,27 | |
| | Cambios mitocondriales apoptóticos (GO:0008637) | 1,39 | |
| lípidos | Proceso catabólico de triglicéridos (GO:0019433) | 4,88 | PRKACB, PPP1CB, ECH1, SESN2. |
| | Proceso catabólico lípido neutro (GO:0046461) | 4,55 | |
| | Proceso catabólico de los lípidos celulares (GO:0044242) | 1,19 | |
| Detoxificación | Respuesta a la sustancia tóxica (GO:0009636) | 1,53 | UQCERS1, CHUK, JAK1, ETS1, CCT7, |
| | Transporte de toxinas (GO:1901998) | 4,65 | TCP1, MTAP, SOD2, SSR1, ETS1, |
| | Respuesta al alcohol (GO:0097305) | 2,15 | HMGCS1, PTK2B, VCAM1, STAT5B, |
| | Respuesta celular al alcohol (GO:0097306) | 2,11 | PTEN. |
| polimerización de prot | Desestabilización de proteínas (GO:0031648) | 4,65 | IMPDH2, SOD2, CPSF7, ALDOA, SRC, GNB2L1, |

| | | | |
|--------------------------------------|---|-------------|--|
| | | | CDC73, CCDC88C. |
| | Regulación de homooligomerización de proteínas (GO:0032462) | 3,33 | |
| | Homotetraproteína (GO:0051289) | 2,73 | |
| | Tetramerización de proteínas (GO:0051262) | 2,04 | |
| Modulación de microorganismos | Modulación por el huésped de la transcripción viral (GO:0043921) | 4,44 | HMGA2, EP300. |
| | Modulación por el huésped de la transcripción del simbiote (GO:0052472) | 4,44 | |
| | Modificación por el huésped de la morfología o fisiología del simbiote (GO:0051851) | 3,45 | |
| regulación de leucocitos | Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002763) | 4,17 | CCNB2, TNFAIP3, FNIP1, TCP1, ADAM17, PTEN, |
| | Regulación de la diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002761) | 2,51 | KDM1A, CHUK, NOTCH2, KLF10, PPARGC1B, |
| | Regulación positiva de la diferenciación leucocitaria (GO:1902107) | 1,95 | CUL4A, CA2, RB1, SRC, ZEB1, STAT5B, BTLA, |
| | Regulación de la diferenciación | 1,61 | VAV3, TNFAIP3, |

| | | | |
|-----------------------|---|-------------|------------------------------------|
| | leucocitaria(GO:1902105) | | VCAM1. |
| | Homeostasis de leucocitos (GO:0001776) | 3,70 | |
| | Regulación del proceso apoptótico de leucocitos (GO:2000106) | 2,90 | |
| | Proceso apoptótico de leucocitos (GO:0071887) | 2,23 | |
| | Diferenciación leucocitaria mieloide (GO:0002573) | 2,57 | |
| | Regulación de la proliferación de leucocitos (GO:0070663) | 1,26 | |
| Ubiquitinación | Desubiquitinación ligada a proteína K48 (GO:0071108) | 4,00 | GNA12, GNB2L1, HERC3, CDK2, |
| | Desubiquitinación ligada a proteína K63 (GO:0070536) | 3,77 | CDC20, PSMD14, PTK2B, RNF111, |
| | Regulación positiva del proceso catabólico proteasomal dependiente de ubiquitina-dependiente (GO:0032436) | 3,09 | PTEN, RPS27A, WWP2, TNFAIP3, USP5. |
| | Regulación del proceso catabólico de proteína proteasomal (GO:0061136) | 2,12 | |
| | Regulación del proceso catabólico proteasomal de la proteína dependiente de ubiquitina | 2,04 | |

| | | |
|--|-------------------------------|--------------------|
| (GO:0032434) | | |
| Ubiquitinación de proteínas | 1,81 | |
| implicadas en el proceso catabólico dependiente de ubiquitina (GO:0042787) | | |
| Regulación de la actividad de la ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051438) | 1,89 | |
| Regulación positiva de la actividad de ubiquitina-proteína transferasa (GO:0051443) | 1,74 | |
| Regulación negativa de la actividad de la ubiquitina- proteína transferasa (GO:0051444) | 1,50 | |
| Regulación positiva de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031398) | 1,61 | |
| Regulación negativa de la ubiquitinación de proteínas (GO:0031397) | 1,25 | |
| Poliubiquitinación de proteínas (GO:0000209) | 1,07 | |
| Desubiquitinación de proteínas (GO:0016579) | 1,50 | |
| lg | Recombinación somática de las | 3,45 MSH6, SWAP70, |

| | | | |
|-------------------------------|--|-------------|--|
| | inmunoglobulinas implicadas en la respuesta inmune (GO:0002208) | | HMGB2. |
| | Recombinación somática de los genes de la inmunoglobulina implicados en la respuesta inmune (GO:0002204) | 3,45 | |
| | Diversificación somática de los receptores inmunes a través de la recombinación de la línea germinal dentro de un único locus (GO:0002562) | 3,45 | |
| | Diversificación somática de los receptores inmunes (GO:0002200) | 2,88 | |
| Regulación de antígeno | Vía de señalización mediada por receptor de antígeno (GO:0050851) | 1,30 | CHUK, VAV3, TAB2, PTEN, RPS27A, NOTCH2, |
| | Respuesta inflamatoria al estímulo antigénico (GO:0002437) | 3,64 | NOTCH1. |
| respuesta al oxígeno | Respuesta a la disminución de los niveles de oxígeno (GO:0036293) | 3,51 | RAF1, SOD2, ETS1, NOTCH1, PLOD1, PTK2B, VCAM1, |
| | Respuesta celular a la disminución de los niveles de | 2,52 | ADAM17, SRC, VHL, PLAU, |

| | | | |
|-------------------|---|-------------|-------------------|
| | oxígeno (GO:0036294) | | HIF1AN, STAT5B, |
| | Respuesta a los niveles de | 3,33 | EP300, ACTN4, |
| | oxígeno (GO:0070482) | | RPS27A |
| | Respuesta celular a los niveles de | 2,31 | |
| | oxígeno (GO:0071453) | | |
| | Diferenciación de granulocitos | 3,13 | KDM1A, CUL4A |
| | (GO:0030851) | | |
| Receptores | Vía de señalización del receptor | 2,93 | CHUK, TNFAIP3, |
| tipo toll | de tipo toll 2 (GO:0034134) | | TAB2, TAB3, TLR6, |
| | Vía de señalización del receptor | 2,58 | RPS27A. |
| | de tipo toll TLR6:TLR2 | | |
| | (GO:0038124) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 2,58 | |
| | de tipo toll TLR1:TLR2 | | |
| | (GO:0038123) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 2,21 | |
| | de tipo toll 10 (GO:0034166) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 2,21 | |
| | de tipo toll 5 (GO:0034146) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 2,15 | |
| | de tipo toll 3 (GO:0034138) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 2,05 | |
| | de tipo toll 9 (GO:0034162) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 2,05 | |
| | de tipo toll 4 (GO:0034142) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 1,83 | |

| | | | |
|-------------------|--|-------------|--|
| | de tipo toll TRIF dependiente (GO:0035666) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 1,78 | |
| | de tipo toll MyD88 independiente (GO:0002756) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 1,67 | |
| | de tipo toll MyD88 dependiente (GO:0002755) | | |
| | Vía de señalización del receptor | 1,32 | |
| | de tipo toll (GO:0002224) | | |
| citoquinas | Regulación negativa de la producción de interferón tipo I (GO:0032480) | 2,65 | CHUK, TNFAIP3, EP300, ATG12, RPS27A, ADAM17, |
| | Regulación de la producción de interferón tipo I (GO:0032479) | 1,72 | NOTCH2, NOTCH1, SRC, TLR6. |
| | Producción de interferón tipo I (GO:0032606) | 1,69 | |
| | Regulación positiva de la producción de interferón tipo I (GO:0032481) | 1,49 | |
| | Secreción de citoquinas (GO:0050663) | 1,30 | |
| | Regulación negativa de la producción de citoquinas (GO:0001818) | 1,14 | |
| regulación | Respuesta al monosacárido | 2,79 | SESN2, SOD2, |

| | | | |
|--------------------|-----------------------------------|------|------------------|
| de glúcidos | (GO:0034284) | | PTK2B, VCAM1, |
| | Respuesta a glucosa | 2,51 | GJA1, PTEN, MET, |
| | (GO:0009749) | | SLC16A1, PRKACB, |
| | Gluconeogénesis (GO:0006094) | 2,42 | PPP1CB, SRC, |
| | Respuesta a los carbohidratos | 2,42 | GAPDH, ALDOA, |
| | (GO:0009743) | | RPS27A, HK1, |
| | Respuesta a hexosa | 2,38 | FUT4. |
| | (GO:0009746) | | |
| | Homeostasis de la glucosa celular | 2,24 | |
| | (GO:0001678) | | |
| | Proceso de biosíntesis de hexosa | 2,19 | |
| | (GO:0019319) | | |
| | Proceso de biosíntesis de | 2,06 | |
| | monosacáridos (GO:0046364) | | |
| | Homeostasis de | 1,72 | |
| | carbohidratos(GO:0033500) | | |
| | Homeostasis de glucosa | 1,72 | |
| | (GO:0042593) | | |
| | Regulación del proceso de | 1,66 | |
| | biosíntesis de carbohidratos | | |
| | (GO:0043255) | | |
| | Regulación del proceso | 1,57 | |
| | metabólico de la glucosa | | |
| | (GO:0010906) | | |
| | Regulación del proceso | 1,44 | |
| | metabólico celular de los | | |

| | | | |
|--|---|-------------|---|
| | carbohidratos (GO:0010675) | | |
| | Proceso metabólico de la glucosa (GO:0006006) | 1,40 | |
| | Regulación del proceso metabólico de los carbohidratos (GO:0006109) | 1,36 | |
| | Proceso catabólico de carbohidratos de un solo organismo (GO:0044724) | 1,23 | |
| | Proceso catabólico de carbohidratos (GO:0016052) | 1,16 | |
| Silenciamien to génico | Silenciamiento génico posttranscripcional por ARN (GO:0035194) | 2,70 | CNOT6, TNRC6B, TNRC6A, CELF1, CDK2 |
| | Silenciamiento génico posttranscripcional (GO:0016441) | 2,70 | |
| | Silenciamiento génico por ARN (GO:0031047) | 2,08 | |
| | Silenciamiento génico (GO:0016458) | 1,77 | |
| | | | |
| Proceso catabólico de proteínas | Regulación positiva de la proteólisis (GO:0045862) | 1,38 | ZNF268, TNFAIP3, GJA1, GNA12, |
| | Regulación positiva del proceso catabólico de proteínas (GO:0045732) | 2,54 | PSMD14, PTK2B, GNB2L1, PTEN, USP5. |
| | Regulación del proceso catabólico | 1,90 | |

| | | | |
|---|--|------|---|
| | de proteínas celulares (GO:1903362) | | |
| | Regulación de la proteólisis involucrado en proceso celular catabólico de proteínas (GO:1903050) | 1,98 | |
| | Regulación positiva del proceso catabólico proteasomal de proteínas (GO:1901800) | 2,63 | |
| | Regulación positiva de la proteólisis celular involucrada en proceso catabólico de proteínas (GO:1903052) | 2,56 | |
| Regulación de proteínas y péptidos | Direccionamiento de proteínas a RE (GO:0045047) | 1,71 | RPN2, RPL19, RPL22, SSR1, |
| | Establecimiento de la localización de proteínas en el retículo endoplásmico (GO:0072599) | 1,70 | RPS27A, GANAB, MGAT5, PIGM, MCFD2, ATG12, |
| | Localización de proteínas en el retículo endoplasmático (GO:0070972) | 1,54 | DMTN, NOTCH2, NOTCH1, SRC, TLR6, ARFIP1, |
| | Modificación postraduccional de proteínas (GO:0043687) | 1,26 | ITPR3, PRKACB, CA2, GJA1, |
| | Secreción de proteínas (GO:0009306) | 1,24 | SLC16A1, HMGA2, CEP57L1, |
| | Regulación del transporte de | 1,41 | FBN2, FLNA, |

| | | | |
|--|--|------|-----------------------------------|
| | péptidos (GO:0090087) | | ZNF268, RB1, |
| | Regulación de la secreción de péptidos (GO:0002791) | 1,19 | SUPT7L. |
| | Secreción de péptidos (GO:0002790) | 1,03 | |
| | Mantenimiento de la localización de proteínas (GO:0045185) | 1,85 | |
| Regulación de células mononucleares | Regulación de la proliferación de células mononucleares (GO:0032944) | 1,03 | IMPDH2, BTLA, VAV3, VCAM1, STAT5B |
| res | Proliferación de células mononucleares (GO:0032943) | 1,03 | |